



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química

Projeto Final de Curso
IQWX01

Vinícius Simas Grilo

Desenvolvimento de biossensor microbiano de metal pesado utilizando
Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudo

Rio de Janeiro

2015

Desenvolvimento de biossensor de metal pesado utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

Vinícius Simas Grilo

Projeto final de curso submetido ao corpo docente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas

Orientadora: Elis Cristina Araújo Eleuthério

Co-orientadora: Bianca Cruz Neves

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Química

Departamento de Bioquímica

Rio de Janeiro

2015

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais José e Ligia pelo incondicional amor e suporte ao longo de toda minha vida. Ao meu irmão Erick, grande Kito, pelas risadas sem motivos, pelos “chafés” e ajuda sem igual nos dias mais difíceis.

À Marcelle Rocha, my little, por todo amor e carinho, por cuidar de mim e se preocupar comigo mesmo quando embarcada, pelos momentos inesquecíveis, pelo apoio e suporte. Mais importante, obrigado por me aturar nessa caminhada pela estrada da vida.

Às minhas orientadoras Elis e Bianca, pelos ensinamentos, conversas, esclarecimentos e por serem sempre solícitas quando eu precisei.

À galera do Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse (LIFE) pelos momentos de descontração e suporte técnico e emocional em momentos de grande tensão.

Ao Leo, Herval e Gil, pois sem a ajuda de vocês a única transformação que eu teria feito até aqui seria pão em torrada.

A todos os meus amigos que me acompanharam nessa difícil jornada que é a graduação e que contribuíram de modo direto ou indireto para que hoje eu esteja onde estou. Em especial, ao meu irmão mais velho Diego Seixas, por toda ajuda, conhecimento passado por osmose ao longo de todo curso e claro, pelos yakissobas de “flango”.

Ao Instituto de Química da UFRJ por me proporcionar estrutura para que pudesse concluir minha graduação em Química com Atribuições Tecnológicas.

Resumo

Projeto de Curso

TÍTULO: DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR MICROBIANO DE METAL PESADO UTILIZANDO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO MODELO DE ESTUDO

ALUNO: Vinícius Simas Grilo

ORIENTADORA: Dr^a Elis Cristina Araújo Eleuthério, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

COORIENTADORA: Dr^a Bianca Cruz Neves - UFRJ

As técnicas analíticas convencionais para detecção de metais pesados, como espectrometria de absorção atômica, são precisas, porém possuem um custo elevado e necessitam de certa capacitação para serem utilizadas. Biossensores microbianos possuem uma série de vantagens frente à técnicas convencionais como especificidade, baixo custo, portabilidade, vida útil mais longa, maior tolerância a variações de pH e temperatura, além de serem mais baratos que enzimas e anticorpos. Neste estudo, utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo, foi verificado o potencial biossensor de uma linhagem mutante dessa levedura baseado no promotor PvSR2 (Stress-Related gene number 2 de *Phaseolus vulgaris*), que responde especificamente a vários metais pesados, entre eles cádmio e mercúrio. Para a construção de tal biossensor, foram utilizados vetores plasmidiais com dois genes repórteres, lacZ e GFP, sob regulação do promotor PvSR2, onde estes foram transformados em *S. cerevisiae* BY4741, gerando duas linhagens mutantes. Para avaliar a capacidade de resposta das leveduras recombinantes à presença de metais pesado, tais células foram expostas a concentrações crescentes de Cd²⁺ e posteriormente avaliada a atividade β-galactosidase e a fluorescência nas mutantes contendo os genes repórteres lacZ e GFP, respectivamente.

Palavras – chave: biossensor, cádmio, PvSR2, *S.cerevisiae*, lacZ, GFP

Abstract

The conventional analytical techniques for detection of heavy metals, such as atomic absorption spectrometry, are precise, but expensive and require proper training in order to use them. Microbial biosensor have many advantages compared to conventional analytical techniques like specificity, low cost, portability, durability and higher tolerance to pH and temperature variations. Besides, they are cheaper than enzymes and antibodies, which are the most common type of biosensors used. In this study, using the yeast *S. cerevisiae* as a model, the potential as a biosensor of a mutant strain based on the promoter PvSR2 (Stress-Related gene number 2 of *Phaseolus vulgaris*), which responds specifically to heavy metals like cadmium and mercury, was verified. In order to do it, the yeast *S. cerevisiae* BY4741 was transformed with plasmid vectors with two reporter genes, GFP and lacZ, under the regulation of the PvSR2 promoter, generating two mutant strains. To evaluate the capacity of the recombinant yeasts to respond to heavy metals, the cells were exposed to increasing concentrations of Cd²⁺ and then the β – galactosidase activity and the fluorescence were measured in the mutant yeasts with the reporter genes lacZ and GFP, respectively.

Keywords: biosensor, cadmium, PvSR2, *S. cerevisiae*, lacZ, GFP.

Sumário

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
2.1. Biossensores.....	2
2.2. Cádmio.....	5
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.4. <i>Phaseolus vulgaris</i> Stress Related Gene 2 (PvSR2)	13
2.5. Bioinformática.....	16
3. Objetivo.....	19
4. Metodologia.....	19
4.1. Lista de meios utilizados e suas composições.....	19
4.2. Construção do plasmídeo <i>in silico</i>	20
4.3. Transformação.....	21
4.3.1. Transformação em <i>E. coli</i>	21
4.3.1.1. Preparo de células competentes.....	21
4.3.1.2. Transformação.....	21
4.3.2. Extração do plasmídeo.....	21
4.3.3. Transformação em <i>S. cerevisiae</i>	22
4.4. Curva de peso seco.....	22
4.5. Curva de crescimento.....	22
4.6. Replica Plating.....	23
4.7. Análise de fluorescência.....	23
4.7.1. Leitor de microplaca.....	23
4.7.2. Microscopia óptica.....	24
4.8. Atividade β – galactosidase	24
5. Resultados e discussão.....	25

5.1. Construção do mapa do vetor plasmidial in silico e alinhamento.....	25
5.2. Curva de crescimento.....	29
5.3. Replica plating.....	30
5.4. Análise de fluorescência.....	31
5.4.1. Leitor de microplacas.....	31
5.4.2. Microscopia óptica.....	34
5.5. Atividade β -galactosidase.....	35
6. Conclusões.....	40
7. Perspectivas.....	41
8. Referências.....	41

Lista de figuras

Figura 1: Gráfico de publicações contendo o termo "biossensor" entre 1980 e 2011, usando a Web of Knowledge (TURNER, 2013).....	3
Figura 2: Gráfico mostrando o valor em US\$ que o mercado de biossensores movimentou ao longo dos anos e sua tendência crescente(TURNER, 2013).....	3
Figura 3: Fluxograma mostrando os diversos tipos de biossensores existentes (Fonte: < http://www.frost.com/prod/servlet/cpo/43865876 >).....	4
Figura 4: Modelo do mecanismo de detoxificação de cádmio em <i>S.cerevisiae</i> (ADAMIS et al., 2009).....	8
Figura 5: Percentual de inibição do sistema MMR como função da concentração de cádmio no meio (JIN et al, 2003).....	10
Figura6: Absorção de cádmio por <i>S. cerevisiae</i> em diferentes fisiologias celulares(ADAMIS et al., 2003).....	13
Figura 7: Sequência da região promotora do gene <i>PvSR2</i> (QI et al, 2007).....	14
Figura 8: Atividade β - glicuronidase (GUS) na presença de vários metais no meio (QI et al, 2007).....	15
Figura 9: Atividade β - glicuronidase (GUS) como função da concentração de metal no meio (QI et al, 2007).....	15
Figura 10: Gráficos que mostram o número de bases (à esquerda) e sequências (à direita) depositadas no banco de dados GenBank. WGS representa, em tradução livre, sequência completa de genoma (do inglês, "whole genome sequence"). (Fonte: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics >).....	16
Figura 11: Reação de hidrólise do ONPG catalisada pela enzima β – galactosidase (Fonte: < http://2011.igem.org/wiki/images/6/6e/ONPG.png >).....	25
Figura 12: Mapa circular do plasmídio pSF-PvSR2-lacZ.....	26
Figura 13: Mapa circular do plasmídio pSF-PvSR2-GFP.....	27

Figura 14: Alinhamento entre as sequências do promotor PvSR2 pedida e as sequências 93GG04 e 93GG02 dos fragmentos dos plasmídios que contém o promotor PvSR2 sintetizada nos plasmídios pSF-PvSR2-GFP e pSF-PvSR2-lacZ respectivamente.....	28
Figura 15: Curva de crescimento da BY4741 – GFP.....	29
Figura 16: Curva de crescimento da BY4741 – lacZ.....	30
Figura 17: Replica plating das cepas BY4741 - GFP (G) e BY4741 - (L) em placas contendo concentrações crescentes de Cd ²⁺	31
Figura 18: Comparação entre os valores de RFU para o meio Dropout 2% de glicose sem as células (meio) e com a BY4741 e a BY4741 - GFP.....	32
Figura 19: Gráfico com os valores de RFU para as cepas E.coli mutante e BY4741 - GFP.....	33
Figura 20: Fotografias obtidas a partir do microscópio óptico.....	34
Figura 21: Atividade β - galactosidase da BY4741 e da BY4741 – lacZ.....	35
Figura 22: Atividade específica em função das diferentes fases de crescimento da BY4741 – lacZ.....	36
Figura 23: Atividade específica da BY4741 – lacZ em função das diferentes condições de indução.....	37
Figura 24: Atividade específica da BY4741 – lacZ em função de diferentes massas de proteínas.....	38
Figura 25: Atividade específica como função da concentração de Cd ²⁺	39
Figura 26: Ajuste linear do grafico de atividade específica pela concentração de Cd ²⁺	40

Lista de tabelas

Tabela 1: Valores de referência segundo Alloway (1995) (apud ABREU et al., 2005) e quantidades de metais pesados em amostras de solo do estado São Paulo (adaptado de ABREU et al, 2005).....6

Tabela 2: Lista dos bancos de dados biológicos (adaptada de LUSCOMBE et al., 2001)....17

Lista de abreviaturas

μM – micromolar

ABRE – elemento responsivo ao ácido abscísico

BER – sistema de reparo por excisão de base (em inglês, *base excision repair*)

CaCl_2 – cloreto de cálcio

Cd – cádmio metálico

Cd^{2+} – íon cádmio

$\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$ – sulfato de cádmio (II) 8/3 hidratado

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – Dropout

EROs – espécies reativas de oxigênio

GFP – proteína fluorescente verde (em inglês, *green fluorescent protein*)

GSH – forma reduzida da glutationa

HSE – elemento de resposta a choque térmico (em inglês, *heat shock responsive element*)

IARC – em inglês, *International Agency of Research on Cancer*

IPTG – isopropyl β -D-1-tiogalactopiranosídeo

lacZ – gene que codifica a enzima β -galactosidase

mM – milimolar

MMR – sistema de reparo de pareamento incorreto (em inglês, *mismatch repair*)

MRE – elemento de resposta a metais (em inglês, *metal responsive element*)

MT - metalotioneína

Na_2CO_3 – carbonato de sódio

NER – sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (em inglês, *nucleotide excision repair*)

OD_λ – densidade óptica, onde λ corresponde ao comprimento de onda de leitura em nm

ONP – o-nitrofenol

ONPG – o-nitrofenilgalactopiranosídeo

ppm – parte por milhão

PvSR2 – *Phaseoulus vulgaris Stress Related gene number 2*

RFU – unidades relativas de fluorescência (em inglês, *relative fluorescence units*)

rpm – rotações por minuto

V_{DNA} – volume de DNA plasmídial que contém 1000 ng de plasmídio

Zn²⁺ – íon zinco

1. Introdução

O cádmio é um metal pesado classificado como carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, do inglês). Sua ocorrência natural é em maior parte associada aos minérios de zinco, cobre e chumbo. Em regiões onde ocorre a mineração e refino destes minérios é possível encontrar cádmio nos rejeitos, que muitas vezes sem tratamento adequado, são despejados no meio ambiente, provocando contaminação ambiental mesmo em baixas concentrações, pois tal metal é bioacumulativo.

Em amostras de solos agricultáveis de São Paulo, Brasil, foram encontradas concentrações de cádmio de 3,4 ppm (ABREU et al., 2005) e tal nível é preocupante, uma vez que metade dessa concentração foi reportada por Jin et al (2003) como sendo extremamente tóxica. Nesta concentração, o cádmio é capaz de inibir mais da metade de um dos principais mecanismos de reparo de lesões do DNA.

Mediante a este quadro, o monitoramento de áreas contaminadas por este metal é extremamente importante para evitar futuros problemas de saúde relacionados ao cádmio, pois além do câncer ele pode ocasionar diversos distúrbios metabólicos e doenças ósseas como osteoporose e osteomalacia. Esse monitoramento é feito geralmente por técnicas analíticas convencionais como espectrometria de absorção atômica ou espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, que são caras e que demandam especialização.

Uma ferramenta analítica que em muitos casos é igualmente poderosa, porém mais econômica, são os biossensores. Os biossensores são compostos por um transmissor de sinal e um elemento biológico capaz de captar o sinal transmitido, onde o elemento biológico pode ser uma enzima, uma célula, um tecido ou ainda microrganismos. Esse tipo de tecnologia possui tendência de aplicação crescente e movimenta cerca de 13 bilhões de dólares em todo mundo (TURNER, 2013). A principal vantagem além do preço é o fato de que biossensores podem ser aplicados *in situ* e dispensam especialização em muitos casos.

Os biossensores enzimáticos são os mais utilizados no mercado. No entanto, a utilização de biossensores microbianos é vantajosa frente ao uso de biossensores enzimáticos, pois estes podem operar em uma maior faixa de temperatura e pH, são mais susceptíveis a manipulação genética. Dentre os microrganismos utilizados nos biossensores, a levedura *S.cerevisiae* possui um alto interesse econômico, pois apesar de ter uma menor capacidade de absorção de metais que outros microrganismos, sua biomassa é facilmente obtida em meio sintético relativamente barato.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Biosensores

Um biossensor é um dispositivo analítico composto pela combinação de um elemento sensorial biológico com um transmissor para produzir um sinal proporcional à concentração do analito (LEIET. al, 2006). O elemento biológico pode ser uma enzima, um anticorpo, uma célula de tecido ou ainda um microrganismo, já o transmissor pode ser uma alteração química no meio, emissão ou absorção de luz, fluorescência, síntese ou degradação de um produto. Possuem uma vasta área de aplicação, sendo utilizados em monitoramento ambiental, na área de saúde, na indústria ou ainda estrategicamente para defesa e segurança (TURNER, 2013).

Segundo Turner (2013), o conceito básico de biossensor foi primeiramente elucidado por Leyland C. Clark em 1962, no que ele descreveu como “eletrodo enzimático”. Tal eletrodo tratava-se de uma inovação de um de seus eletrodos de oxigênio, onde nele estava imobilizada a glicose oxidase, enzima responsável pela oxidação da glicose em sua respectiva lactona, que por fim é hidrolisada à ácido glicônico. Dessa forma, foi construído de maneira simples e prática, um biossensor para glicose, cujo princípio é utilizado até hoje para a detecção e monitoramento de glicose no sangue humano, essencial para pessoas com diabetes.

Existe atualmente uma enorme quantidade de publicações na área de biossensores (Figura 1). De acordo com Turner (2013), tais giram em torno de dois tipos principais de instrumentação: máquinas de laboratório sofisticadas e de alto desempenho, capazes de fazer medidas rápidas, precisas e convenientes de componentes ou interações biológicas complexas; e dispositivos portáteis, fáceis de usar que dispensam especialização, para uso em diversos ambientes ou aplicações *in situ*.

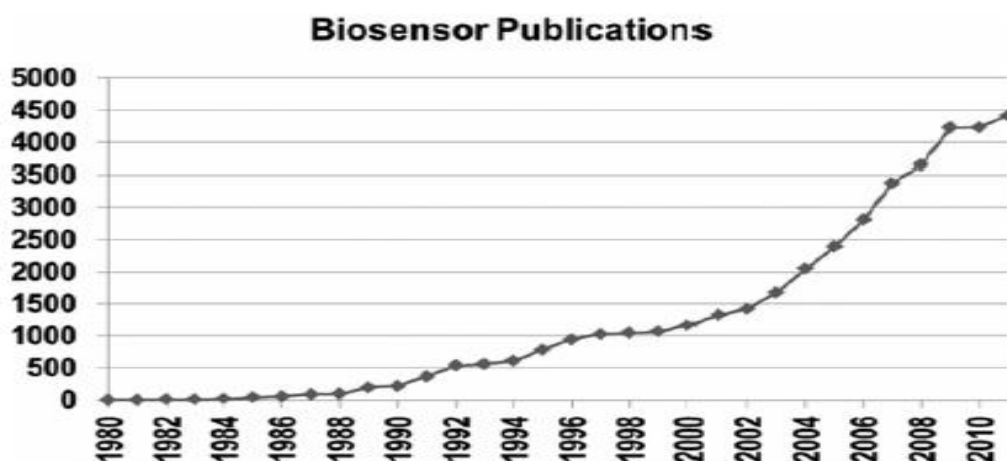


Figura 1: Gráfico de publicações contendo o termo "biossensor" entre 1980 e 2011, usando a Web of Knowledge (TURNER, 2013).

Mediante ao desenvolvimento tecnológico e industrial, bem como o aumento da longevidade, a tecnologia de biossensores se faz muito necessária, em especial os de instrumentação prática, simples e de fácil manejo, que dispensa especialização. Um levantamento (Figura 2) apontado por Turner (2013) mostra que, por conta da versatilidade e potencial de aplicação dos biossensores, essa tecnologia possui um grande interesse comercial e movimentou no ano de 2013 cerca de 13 bilhões de dólares e possui tendências crescentes.

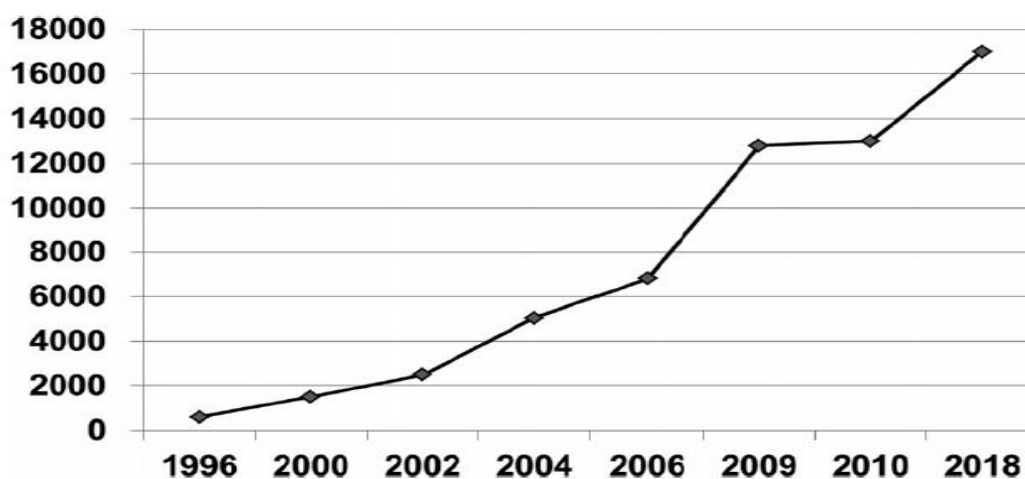


Figura 2: Gráfico mostrando o valor em milhões de US\$ que o mercado de biossensores movimentou ao longo dos anos e sua tendência crescente (TURNER, 2013).

Dentre os mais variados tipos de biossensores (Figura 3), a maior parte deles utiliza enzimas como biomolécula por conta de sua alta especificidade para um substrato ou inibidor.

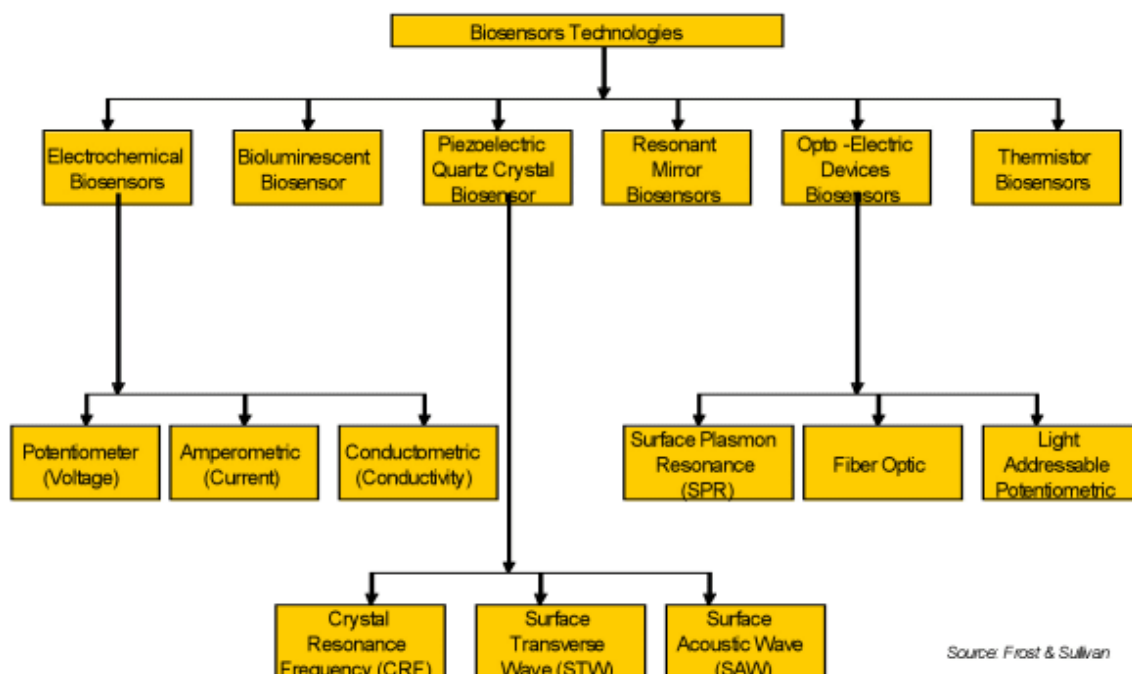


Figura 3: Fluxograma mostrando os diversos tipos de biossensores existentes (Fonte: <<http://www.frost.com/prod/servlet/cpo/43865876>>)

Porém, de acordo com Lei et al (2006), apesar de sua alta especificidade, a utilização de enzimas como biossensores é limitada por conta do processo de purificação da mesma, que é caro e demanda tempo. A utilização de biossensores microbianos oferece uma grande vantagem frente à ao uso de enzimas, como susceptibilidade à manipulação genética, resistência a uma maior faixa de pH e temperatura e a capacidade sensorial para diversos compostos. A desvantagem seria a perda de especificidade do biossensor, porém esta pode ser contornada ou amenizada por meio da tecnologia do DNA recombinante, onde esta oferece uma gama variada de possibilidades como aumentar uma atividade de uma enzima já existente no microrganismo usado como modelo de estudo, promover uma superexpressão autóloga ou ainda uma expressão heteróloga, dependendo do objetivo desejado e claro, das limitações do modelo.

Biossensores microbianos são produzidos por meio da imobilização do microrganismo no transmissor de sinal, de modo que estes fiquem muito próximos um do outro. A resposta, estabilidade operacional e vida útil do biossensor são dependentes da

estratégia de imobilização utilizada, podendo esta ocorrer por métodos químicos ou físicos (LEI et al, 2006).

Dentro dos métodos químicos, estão a ligação covalente e a ligação cruzada, onde o primeiro consiste na formação de uma ligação covalente entre os grupos funcionais da parede celular (ou membrana) do microrganismo e os do transmissor; ao passo que o segundo consiste na formação de ligações entre diversos grupos funcionais da membrana celular externa e os do transmissor por meio de reagentes multifuncionais, visando a construção de uma rede de ligações. Ambos os métodos utilizam reagentes danosos ao microrganismo, porém no de ligação covalente a viabilidade celular é totalmente comprometida, enquanto que no de ligação cruzada, a viabilidade celular é afetada, mas a atividade biológica não, permitindo a utilização das enzimas intracelulares na detecção do analito. (LEI et al, 2006).

Os métodos físicos consistem em adsorção e aprisionamento, onde ambos os métodos não se utilizam da formação de ligações químicas entre o microrganismo e o transmissor. Por não utilizarem reagentes químicos nocivos, promovem pouca perturbação à estrutura e funções originais do microrganismo, o que faz desses métodos essenciais quando células viáveis são necessárias. A adsorção física é o método de imobilização mais simples, porém usar somente este método faz com que o biossensor perca estabilidade a longo prazo por conta da dessorção dos microrganismos com o tempo. (LEI et al, 2006).

2.2. Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal pesado de número atômico 48, peso atômico 112,4, densidade 8,6 g/mL, ponto de fusão de 320,9°C e ponto de ebulição de 765°C. É um metal maleável de cor cinza esbranquiçado de forma cristalina hexagonal. Sua ocorrência natural se dá nos minérios de zinco, cobre e chumbo, e por conta disso, elevadas concentrações deste metal no ar, água e solo podem ser observadas próximo às fontes industriais, em particular as de extração e refino de minérios de zinco e chumbo. Os compostos mais comuns de cádmio são acetato, sulfeto, sulfato, carbonato, óxido e cloreto, sendo o cloreto, sulfato e acetato de cádmio solúveis em água enquanto que o óxido e carbonato de cádmio são insolúveis (IARC, 1993; NORDBERG et al, 2007).

Com relação à sua aplicação, o cádmio é utilizado na forma metálica como anticorrosivo, e sob a forma de alguns compostos como pigmento e estabilizante para plásticos. Em ambas as formas, pode ser utilizado em baterias e pilhas de Ni – Cd, componentes eletrônicos e ainda em reatores nucleares. Por conta de sua toxicidade, o uso de

cádmio vem diminuindo e é restrito por lei em alguns países. (IARC, 1993; BERTIN e AVERBECK, 2006; NORDBERG et al, 2007).

Além da intoxicação por conta da exposição ocupacional, a intoxicação humana se da principalmente por meio de cigarros, devido à quantidade de cádmio presente nele, mas também pode advir da contaminação da água, da comida e do ar. Intoxicação aguda é responsável por danos aos pulmões, testículos e fígado. Já a exposição crônica leva à doenças que obstruem as vias aéreas, enfisemas, falência renal, complicações renais e diabéticas, desregulação da pressão sanguínea, problemas ósseos e imunossupressão. Tais efeitos negativos ocorrem por conta da bioacumulação, pois a excreção deste metal pelo organismo se da de forma bem lenta, de modo que sua meia vida seja de 15 a 20 anos. (BERTIN e AVERBECK, 2006; IARC, 1993).

Conforme Abreu et al (2005) expõem em seu trabalho realizado com amostra de solos de diversas áreas do estado de São Paulo, a contaminação por cádmio de solos agricultáveis no Brasil pode chegar a níveis preocupantes. A contaminação pode ser devido ao uso de fertilizantes no tratamento de reposição de micronutrientes, por deposição em caso de regiões próximas a áreas industriais ou ainda de maneira não pontual e difusa. O problema da contaminação dos solos agricultáveis é que a maioria das plantas possuem uma alta capacidade de absorção de metais, incluindo o cádmio, onde elas podem viver com concentrações de cádmio que para elas não é nociva, mas que para o ser humano é extremamente tóxica.

Tabela 1: Valores de referência segundo Alloway (1995) (apud ABREU et al, 2005) e quantidades de metais pesados em amostras de solo do estado São Paulo (adaptado de ABREU et al, 2005).

Metal pesado	Valores de Referência (mg/kg)	Conteúdo nos solos em SP (mg/dm ³)
Cd	3	3.4
Cr	25	28,5 – 42,9
Ni	20	25,9 – 65,1
Pb	600	26 - 64

Na tabela 1, a concentração máxima de cádmio encontrada nos solos de SP é de 3,4 ppm, o que corresponde à uma concentração de aproximadamente 30,25 µM. De acordo com Bertin e Averbeck (2006), concentrações entre 1 e 5 µM de cádmio no organismo já são suficiente para produzir efeitos citotóxicos e Jin et al (2003) mostram que a concentração de 15 µM deste metal já é capaz de inibir 68% de um dos sistemas de reparo de lesões no DNA.

Segundo Bertin e Averbeck (2006) e Nordberg (2007), a toxicidade do cádmio foi divulgada primeiramente na década de 50 no Japão, onde este metal seria o causador da doença Itai-itai. Pela primeira vez a contaminação do cádmio foi descrita como nociva à saúde humana. Os sintomas mais severos eram lesão renal, imunodeficiências, apatia, danos aos ossos (osteoporose e osteomalacia), dores femorais, lumbago (lombalgia) e deformações ósseas.

De acordo com Bertin e Averbeck (2006), Hartwig (2010) e Filipič (2012), a espécie reativa do cádmio uma vez dentro das células é o Cd^{2+} , e possui múltiplos efeitos nocivos. O cádmio afeta o ciclo de progressão celular, diferenciação, proliferação, a replicação e reparo do DNA, as vias apoptóticas e induz estresse oxidativo de modo indireto.

A nível de expressão gênica, Bertin e Averbeck (2006) e Hartwig (2010) afirmam que o cádmio promove a superexpressão de uma grande quantidade de proteínas de diversas vias metabólicas, incluindo proto oncogenes como *c-fos*, *c-myc*, *c-jun*, de modo que a exposição a esse metal é capaz de provocar grandes distúrbios metabólicos. A alteração nos níveis de expressão de proto oncogenes pode levar a uma proliferação celular e consequente desenvolvimento de tumores. Além da superexpressão de proteínas, a exposição ao cádmio pode levar a inibição de algumas proteínas, como a proteína supressora de tumor p53, pois provoca uma mudança conformacional nesta ao substituir os íons Zn^{2+} na estrutura, de modo que esta perde sua função de supressão de oncogenes.

Nos mamíferos, o principal mecanismo de detoxificação do cádmio é via formação de complexos deste metal com as proteínas metalotioneínas (MTs). Essas proteínas são ricas em resíduos de cisteína e são capazes de se ligar à metais pesados, protegendo o organismo contra a toxidez do cádmio e também contra estresse oxidativo. A capacidade de se ligar à metais pesados advém justamente da quantidade de resíduos de cisteínas presentes, cerca de 30 %. A intoxicação por cádmio resulta em um aumento da produção de MTs e a transativação dos genes de MTs se dá nos elementos de resposta a metais, presente nos promotores proximais deste gene; e nos fatores de transcrição responsivos a metal que contém dedos de zinco (BERTIN e AVERBECK, 2006; HARTWIG, 2010).

Outro mecanismo de detoxificação de cádmio importante observado tanto em mamíferos quanto em *S.cerevisiae* é a quelatação do metal por meio da glutatona (GSH). O GSH é um tripeptídeo, composto por resíduos de glutamato, cisteína e glicina, que além da detoxificação do cádmio atua como principal antioxidante não enzimático em organismos aeróbicos. A interação com o cádmio se dá pela forte interação entre o metal e o grupo tiol presente no resíduo de cisteína, levando a formação do complexo $\text{Cd}(\text{GS})_2$. Nos mamíferos, este complexo é bombeado para fora da célula pela proteína Mrp1, enquanto que em *S.cerevisiae* ele é transportado para o vacúolo através da proteína Ycf1, que é análoga à

proteína mamífera e cujo mecanismo proposto por Adamis et al (2009) pode ser observado na figura 4. (ADAMIS et al., 2009)

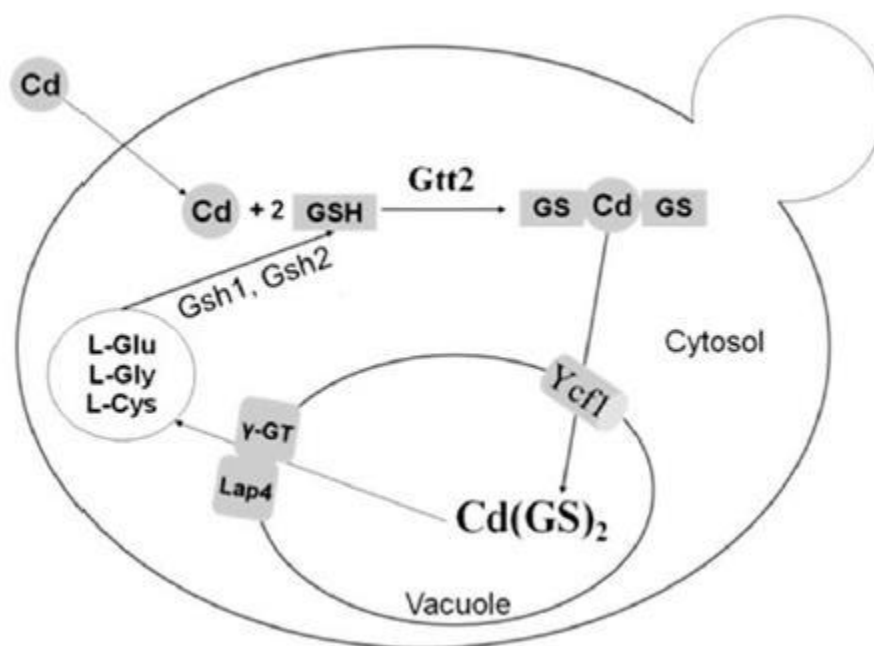


Figura 4: Modelo do mecanismo de detoxificação de cádmio em *S.cerevisiae*. Sejam os significados das siglas: Cd, cádmio; L-Glu, L-Cys e L-Gly, L-aminoácidos glutamato, cisteína e glicina respectivamente; GSH, forma reduzida da glutatona; Gtt2, glutatona transferase 2; Ycf1, transportador vacuolar; Gsh1 e Gsh2, enzimas responsáveis pela síntese de GSH; GS-Cd-GS e $Cd(GS)_2$, complexo formado entre o cádmio e glutatona; γ -GT, gamma-glutamyl transferase; Lap4, aminopeptidase vacuolar (ADAMIS et al., 2009).

Segundo Averbeck e Bertin (2006) e Hartwig (2010), o cádmio possui uma grande afinidade por grupamentos sulfidríla (SH). Hartwig (2010) explica que algumas destas proteínas são chamadas de dedos de zinco e compõem uma família de proteínas onde o zinco é complexado através de quatro resíduos invariantes de cisteína e/ou histidina, formando um domínio de dedo de zinco. Tal domínio está envolvido em ligação com DNA e também em interações do tipo proteína-proteína. A maioria das estruturas de dedos de zinco está descrita na literatura como motivos de ligação com DNA em fatores de transcrição e também foram identificadas em proteínas de reparo de DNA e controle de ciclo celular.

Apesar de o cádmio (II) não ser capaz de participar de reação redox sob condições fisiológicas, ele induz um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio intracelular de modo indireto: diminuindo os níveis de moléculas antioxidantes como a glutatona (GSH) e inibindo enzimas antioxidantes, como a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona redutase. Essas EROs são extremamente nocivas à célula, podendo gerar modificações oxidativas nas bases do DNA, afetar a permeabilidade da membrana citoplasmática e induzir a quebra do DNA em fita simples. É importante ressaltar que o

cádmio (II) não se liga ao DNA e nem interage de forma estável com o mesmo. O estresse oxidativo sozinho não é considerado suficiente para originar um tumor, apesar de poder promover o crescimento de um tumor já existente por meio da desregulação do crescimento celular. Esse mecanismo atua em conjunto com outros processos inibitórios induzidos pelo cádmio (II) para ter um efeito carcinogênico.

Dos sistemas de reparo de DNA, três são afetados pelo cádmio: reparo de pareamento errado (MMR, do inglês), reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês) e por excisão de bases (BER, do inglês).

O mecanismo de reparo MMR atua na correção de erros de replicação, como pareamentos incorretos oriundos ou por uma substituição de bases (A-G ou T-C) ou por inserção/deleção em uma das fitas do DNA. Esse mecanismo envolve várias proteínas, que reconhecem, fazem a excisão e reparo de bases com pareamento incorreto. Ele também é acionado para reparar outras lesões no DNA induzidas pelo metabolismo intracelular normal ou pela ação de agentes químicos ou físicos do meio. Erros de pareamento apresentam potencial mutagênico e tumorigênico. Diversos estudos mostraram que já em baixas concentrações (5 μ M), o cádmio atua como inibidor de algumas proteínas do sistema MMR, como MSH2-MSH6 (BERTIN e AVERBECK, 2006; HARTWIG, 2010; FILIPIČ, 2012).

Jin et al. (2003) mostraram que o cádmio é extremamente mutagênico e que seu potencial como inibidor aumenta de acordo com sua concentração no meio. Essa ação mutagênica já é observável em concentrações encontradas no meio ambiente contaminado e em níveis que podem ser encontrados acumulados no corpo humano. Na figura 5, é possível observar o percentual de inibição do sistema MMR de acordo com a concentração de cádmio.

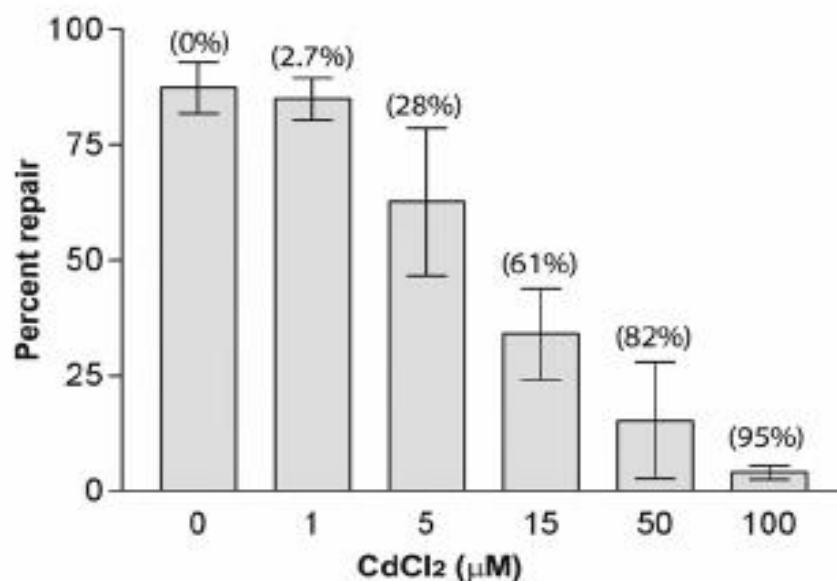


Figura 5: Percentual de inibição (entre parênteses no gráfico) do sistema MMR como função da concentração de cádmio no meio (JIN et al., 2003)

O sistema NER é responsável por reparar danos induzidos por produtos químicos genotóxicos que formam adutos volumosos de DNA, cross-links de DNA e produtos originados de reações fotoquímicas por conta da radiação ultravioleta (UV). O principal papel desse sistema é remover as lesões no DNA que provocam distorção na dupla-hélice e impossibilitam a transcrição e replicação. Em humanos, o NER envolve pelo menos 30 proteínas em uma ordem definida. O NER é iniciado pela proteína xeroderma pigmentosum (XP) do grupo C (XPC), que atua como um sensor de danos ao DNA e recruta outros componentes do NER, como a XPA. A exposição ao cádmio interfere em diferentes etapas do NER, por exemplo, inibindo a ação da XPA, que é responsável por reconhecer o dano no DNA. O cádmio também promove perturbação no desligamento do XPC e XPA de regiões do DNA danificadas por UV tipo C. A consequência de um sistema NER defeituoso em humanos é demonstrada por três síndromes autossômicas recessivas (xeroderma pigmentosum, síndrome de Cockayne e tricotiodistrofia), que estão associadas com distúrbios ao desenvolvimento e à saúde, incluindo uma maior susceptibilidade ao câncer nos pacientes com alguma dessas síndromes (BERTIN e AVERBECK, 2006; HARTWIG, 2010; FILIPIČ, 2012).

O sistema BER permite a reparação de danos ao DNA provocados pelo próprio metabolismo celular e agentes genotóxicos (UV tipo A, raios X, agentes alquilantes), como a modificação oxidativa de bases do DNA e quebras da fita dupla em fita simples. A ação desse sistema é essencial para reparo de danos gerados pela oxidação das bases e de

quebra em fitas simples de DNA, prevenindo a mutagênese. A presença do cádmio inibe e modifica algumas proteínas deste sistema como a formamidopirimidina glicosilase, enzima responsável por reparar o dano mais comum ao DNA por meio de estresse oxidativo, que é a formação 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. Quando esta base é formada, se não for reparada, leva a um pareamento incorreto, que após a replicação do DNA promove a transversão de das bases G-C em T-A. Esse tipo de dano é altamente mutagênico e promove instabilidade genômica (AVERBECK e BERTIN, 2006; HARTWIG, 2010; FILIPIĆ, 2012).

2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae é um microrganismo eucarioto, unicelular e não patogênico. Foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma 100% sequenciado, em 1996. Desde então passou a ser muito utilizado como modelo de estudo para os mais diversos objetivos como análise de função e expressão gênica, interações entre proteínas e estudo de doenças (MAGER e WINDERICKX 2005, BOTSTEIN e FINK 2011).

S. cerevisiae é de fácil manipulação genética, onde mutações, interrupções ou marcações gênicas e outras técnicas de biologia molecular são aplicadas com relativa facilidade. Avanços na tecnologia do DNA recombinante a torna um modelo versátil e excepcional, podendo esta ser aplicada no campo da pesquisa medicinal e também na indústria, na produção de biocombustíveis, bebidas e alimentos.

Segundo Botstein e Fink (2011), pouco depois de 1996 a comunidade científica que utilizava *S. cerevisiae* em seus estudos organizou uma biblioteca de mutantes deste microrganismo. Atualmente, é possível obter qualquer tipo de informação e atualização sobre *S. cerevisiae* no banco de dados online “Saccharomyces Genome Database” (<<http://www.yeastgenome.org/>>).

Desde 1996 o número de genes de *S. cerevisiae* que possuíam sua função biológica conhecida subiu de 30% para 85%, e que cerca de 17% dos genes dessa levedura são membros de famílias de genes ortólogos à genes associados à doenças humanas. Além disso, a caracterização de proteínas humanas defeituosas em leveduras, por meio da expressão gênica heteróloga, pode revelar funções enzimáticas aberrantes que podem não estar aparentes em testes em humanos. Outro benefício de se estudar a função de genes associados a doenças humanas em leveduras é o potencial para remediação da deficiência responsável pela doença (BOTSTEIN e FINK, 2011).

Leveduras também desempenham um papel importante na área industrial. Isso se deve ao fato de possuírem uma série de vantagens frente a outros microrganismos, como

baixo custo de meio de cultivo e um histórico de alta eficiência em tecnologias de fermentação. Elas também são um subproduto dos processos de produção, o que faz delas um commodity valioso para alimentação animal sem que haja custo adicional para isso. Essas vantagens são ainda mais críticas quando se trata da produção de biocombustíveis, onde o produto é produzido em uma escala imensa. Leveduras já são utilizadas no Brasil e na China para a produção de etanol como combustível (BOTSTEIN e FINK, 2011).

Com o rápido desenvolvimento industrial, a quantidade de rejeitos contendo metais pesados que são continuamente despejados direta ou indiretamente no ambiente, especialmente em países em desenvolvimento, podem trazer sérios problemas de poluição ambiental a ponto de ameaçar a vida local. De acordo com Wang e Chen (2006), os métodos convencionais de remoção de íons metálicos de soluções aquosas como precipitação química, troca iônica, tratamento eletroquímico, tecnologias de membrana e adsorção em carbono ativado apresentam algumas limitações. Por exemplo, a precipitação química e tratamento eletroquímico são ineficientes em baixas concentrações de metais, ou seja, da faixa de 1 a 100 mg/L (ppm).

Os outros métodos são extremamente caros quanto utilizados para tratar uma grande quantidade de rejeito com baixas concentrações de metais. Um processo alternativo para tratar da problemática de grande volume de rejeito e baixa concentração de metais é a utilização de bioabsorventes, onde estes são capazes de detectar baixos teores de metais em solução aquosa, podendo levar concentrações da ordem de ppb para ppt (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997; VOLESKY, 1990 apud WANG e CHEN, 2006) .

Apesar de *S.cerevisiae* possuir uma bioabsorção medíocre, é um biomaterial visado para estudo de bioabsorção por conta de suas características únicas para remoção de metais em comparação com outros microrganismos. São fáceis de cultivar em larga escala, podendo ser cultivadas usando técnicas de fermentação não sofisticadas em meios de cultivo não caros. A biomassa de *S.cerevisiae* pode ser obtida de diversas indústrias de alimentos e bebidas, pois é subproduto do processo fermentativo e ao contrário de outras biomassas industriais não possuem segredo de produção, o que facilita sua aquisição. Essa levedura é considerada segura de um modo geral, ou seja, não é patogênica. *S.cerevisiae* também é aplicada como um organismo modelo para identificar os mecanismos de bioabsorção envolvidos na remoção de íons metálicos do meio, principalmente para explorar as interações metal – microrganismo a nível molecular (WANG e CHEN, 2006).

A bioabsorção de metais por *S.cerevisiae* foi investigada de diferentes formas, como células mortas ou vivas, intactas ou desativadas, imobilizadas ou livres, selvagem ou mutante, engenheirada ou não engenheirada, culturas de laboratório ou cepas de rejeito industrial. Além disso, Wang e Chen (2006) mostram que dentre alguns fatores que influem sobre a bioabsorção de metais estão inclusos a idade celular, propriedades dos íons

metálicos em solução aquosa, condições de cultivo, pH, temperatura, tempo de contato, entre outros. Para Adamis et al. (2003), o fator que mais influencia a absorção de metais é o estado fisiológico da levedura e que quando esta se encontra no estado estacionário possui a maior eficiência de remoção dos metais do meio, chegando a absorver 97% em um período de 24 horas (figura 6).

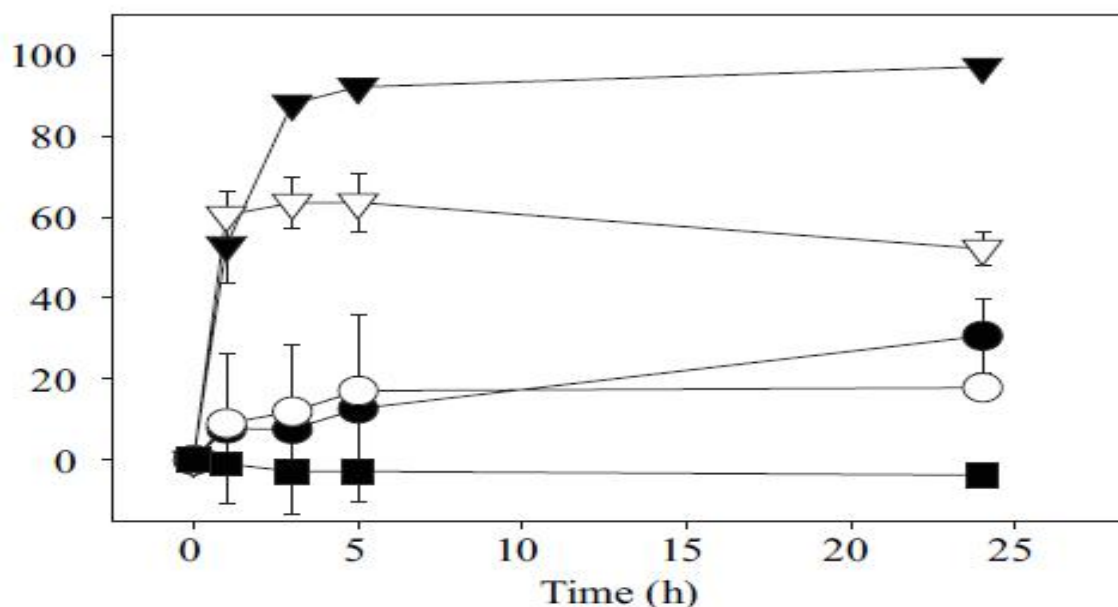


Figura 6: Absorção de cádmio por *S. cerevisiae* em diferentes fisiologias celulares. Células mortas (■), em fase exponencial sem pré-aquecimento (●), fase exponencial pré tratadas com aquecimento de 40°C/1h (○), fase estacionária células frescas (▼) e fase estacionária células secas (▽) (ADAMIS et al., 2003).

2.4. *Phaseolus vulgaris* Stress Related Gene 2 (*PvSR2*)

Segundo Qi et al (2007), o *PvSR2* é um gene que responde especificamente à metais pesados, mas não a outros tipos de estresse ambiental. A sequência da região promotora deste gene pode ser observada na figura 7.

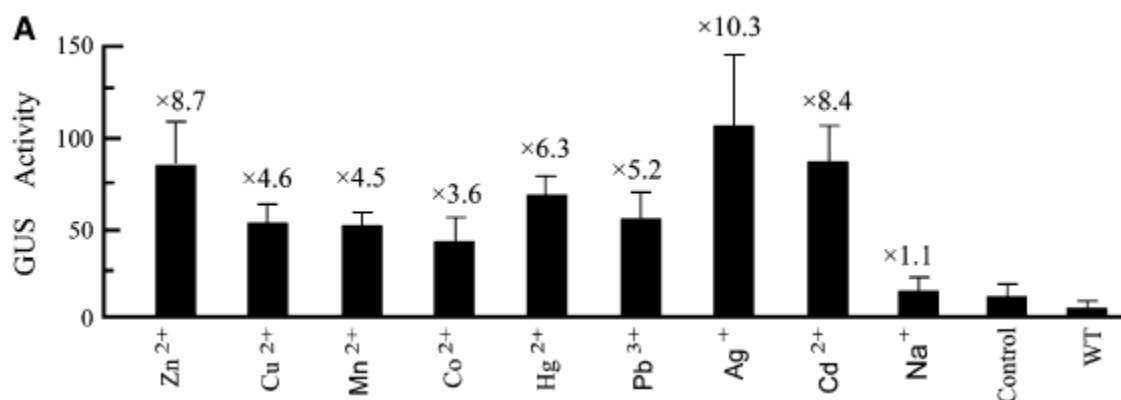


Figura 8: Atividade β - glicuronidase (GUS) na presença de vários metais no meio (QI et al., 2007).

As concentrações das soluções dos metais pesados utilizadas na figura 5 foram 20 μM para HgCl_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_3$ e AgNO_3 ; e 100 μM para ZnSO_4 , CoCl_2 , CuSO_4 e MnCl_2 . Foi possível observar que houve um grande aumento da atividade em relação ao controle que não contém o promotor PvSR2 (figura 8).

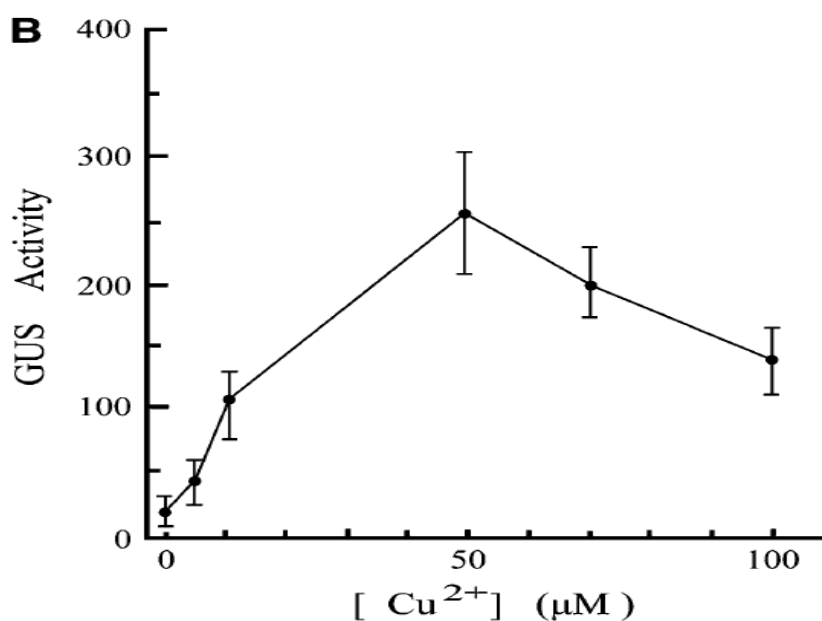


Figura 9: Atividade β - glicuronidase (GUS) como função da concentração de metal no meio (QI et al., 2007).

Na figura 9, foi mostrado que a linhagem mutante que contém o promotor PvSR2 possui resposta ao metal e que esta varia de acordo com a concentração do metal no meio.

Esse dado mostra que tal promotor é capaz de identificar baixas concentrações do metal e, como sugerido por Qi et al (2007), pode ser utilizado para reportar contaminação ambiental por metal pesado.

2.5. Bioinformática

Bioinformática pode ser definida como o tratamento computacional e processamento de informação genética, segundo Ouzounis e Valencia (2003). De acordo a definição citada por Luscombe et al (2001), bioinformática é a conceptualização biológica em termos de moléculas e a aplicação de técnicas de informática para compreender e organizar a informação associada a essas moléculas em larga escala.

Dados biológicos são produzidos a uma taxa fenomenal (figura 7). É estimado que a quantidade de informação disponível dobre a cada 15 meses (LUSCOMBE et al., 2001). Com essa quantidade de dados disponíveis, computadores se tornaram indispensáveis no ramo da pesquisa biológica por serem capazes de processar uma enorme quantidade de dados complexos. Logo, os avanços no campo da bioinformática são acompanhados do desenvolvimento tecnológico.

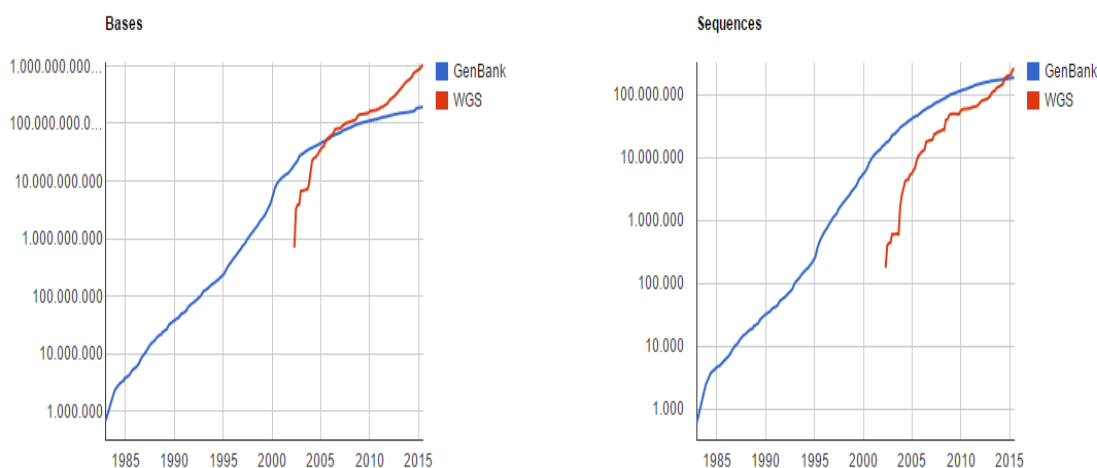


Figura 10: Gráficos que mostram o número de bases (à esquerda) e sequências (à direita) depositadas no banco de dados GenBank. WGS representa, em tradução livre, sequência completa de genoma (em inglês, “whole genome sequence”). (Fonte: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics>>)

Segundo Luscombe et al. (2001), a bioinformática possui três focos principais: organizar os dados de tal forma que permita pesquisadores acessar a informação já existente e submeter novas assim que forem produzidas; desenvolvimento de ferramentas e

recursos para auxiliar a análise de dados; e usar as ferramentas para analisar os dados e interpretar os resultados de modo que haja coerência e significado biológico.

No que diz respeito à fonte de informação a ser trabalhada, Luscombe et al. (2001) propõe uma divisão em sequências brutas de DNA, sequências de proteínas, estruturas macromoleculares, sequências de genomas e dados de genomas completos. Com relação a organização da informação em larga escala, há uma série de bancos de dados online mostrados na tabela 1. O conceito que sustenta os métodos de pesquisa em bioinformática é o tanto de dado que pode ser agrupado baseado em similaridades biológicas significativas

Tabela 2: Lista dos bancos de dados biológicos (adaptada de LUSCOMBE et al., 2001).

Banco de dados	URL
Sequência de proteína (primária)	
SWISS-PROT	www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html
PIR-International	www.mips.biochem.mpg.de/proj/protseqdb
Sequência de proteína (compósito)	
OWL	www.bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/OWL
NRDB	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein
Sequência de proteína (secundárias)	
PROSITE	www.expasy.ch/prosite
PRINTS	www.bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.html
Pfam	www.sanger.ac.uk/Pfam/
Estruturas macromoleculares	
Protein Data Bank (PDB)	www.rcsb.org/pdb
Nucleic Acids Database (NDB)	ndbserver.rutgers.edu/
HIV Protease Database	www.ncifcrf.gov/CRYSHIVdb/NEW_DATABASE
ReLiBase	www2.ebi.ac.uk:8081/home.html
PDBsum	www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum
CATH	www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath
SCOP	scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop
FSSP	www2.embl-ebi.ac.uk/dali/fssp
Sequência de nucleotídeos	
GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank
EMBL	www.ebi.ac.uk/embl

DDBJ	www.ddbj.nig.ac.jp
Sequência de genoma	
Entrez genomes	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome
GeneCensus	bioinfo.mbb.yale.edu/genome
COGs	www.ncbi.nlm.nih.gov/COG
Banco de dados integrados	
InterPro	www.ebi.ac.uk/interpro
Sequence retrieval system (SRS)	www.expasy.ch/srs5
Entrez	www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez

As sequências de proteínas são classificadas como primária, compósito ou secundária. Os bancos de dados primários contêm as sequências de proteínas, suas funções, domínio estrutural e modificações pós-traducionais. Os bancos de dados compósitos comprimem e filtram sequências de dados de diferentes bancos de dados primários para produzir um conjunto de combinações não redundantes, que são mais completas que os dados individuais e também, incluem dados de sequência de proteínas de regiões codificantes de bancos de dados de sequências de DNA. Os bancos de dados secundários contêm informações derivadas de sequências de proteínas e ajudam ao usuário determinar se uma nova sequência pertence à uma certa família conhecida de proteínas (LUSCOMBE et al., 2001).

Os bancos de dados de estruturas macromoleculares oferecem arquivos primários de todas as estruturas tridimensionais de macromoléculas como proteínas, RNA, DNA e vários complexos. Já os bancos de dados de nucleotídeos e sequências de genoma fornecem uma série de dados sobre sequências de DNA para cada gene que codifica uma proteína e seus produtos de RNA, genomas completos, todos os cromossomos em um organismo, detalhes de um cromossomo, marcação de regiões codificantes e não codificantes.

A pesquisa mais rentável em bioinformática resulta, de acordo com Luscombe et al., (2001), da integração de múltiplas fontes de dados. Dessa forma, certas peças de informação são colocadas em contexto em relação a outras, porém essa relação nem sempre é obtida com sucesso, por conta das inúmeras diferenças de nomenclaturas e de formatos de arquivos.

Existem muitos campos que utilizam as ferramentas disponibilizadas pela bioinformática. No entanto, cada campo requer tipos diferentes de técnicas de informática. Para análise de sequências, as técnicas incluem métodos de comparação de linhas, como busca textual e algoritmos de alinhamento unidimensionais. Identificação de motivos e

padrões de sequências para sequências múltiplas dependem de técnicas de aprendizado de máquina, agrupamento e mineração de dados. Técnicas de análise estruturais em 3D incluem cálculos de geometria Euclidiana combinados com a aplicação básica de físico-química, representações gráficas de superfícies e volumes, comparação estrutural e métodos de correspondência em 3D. Para simulações moleculares são aplicadas as mecânicas Newtoniana, quântica e molecular e cálculos eletrostáticos (LUSCOMBE et al., 2001).

A evolução da bioinformática trouxe consigo muitas aplicações práticas. Uma de suas forças motrizes é a busca por similaridades entre biomoléculas diferentes. Uma aplicação prática de buscar homologia em proteínas é poder propor, com a devida cautela, funções para uma nova proteína com base em uma proteína homóloga amplamente conhecida. Uma abordagem equivalente também é usada no campo da genômica, onde essa ferramenta é utilizada para confirmar sequências codificantes em novos genomas sequenciados e sugerir quais as funções deste gene. Outra aplicação seria auxiliar no design inteligente de drogas, diminuindo dessa forma gastos envolvidos na pesquisa. Ainda na área de ciências médicas, a bioinformática possibilitou a análise de expressão gênica, onde recentemente, diversos trabalhos envolvendo este tema utilizam dados de expressão gênica de uma célula afetada por uma certa doença, como câncer, e compara com os níveis de expressão gênica de uma célula saudável. Tal comparação é muito útil na identificação da causa da doença e fornece informação sobre alvos em potencial para medicamentos que venham a ser desenvolvidos para a doença em questão.

3. Objetivo

Construir um biossensor microbiano de metal pesado utilizando construções plasmídias contendo o promotor PvSR2 e os genes repórteres GFP e LacZ, utilizando *S. cerevisiae* como modelo de estudo.

4. Metodologia

4.1. Lista de meios e suas composições, reagentes e cepas utilizadas

- Meio Luria-Bertani (LB): 1,0% de triptona, 0,5% de extrato de lêvedo e 1,0% NaCl.
- Meio LB ágar: 1,0% de triptona, 0,5% de extrato de lêvedo, 1,0% NaCl e 1,4% de ágar
- Meio Dropout (DO): 2% de glicose, 0,67% de base nitrogenada sem aminoácidos e 0,2% de mistura Dropout sem uracila.

- Meio DO sólido: 2% de glicose, 0,67% de base nitrogenada sem aminoácidos, 0,2% de mistura Dropout sem uracila e 2% de ágar.
- Mistura Dropout sem uracila: uma mistura homogênea de 0,5 g de L-adenina, 10,0 g de L-leucina e 2,0 g de todos os outros L-aminoácidos exceto L-uracila.
- Meio YPD: 2% de glicose, 2% de triptona e 1% de extrato de lêvedo.
- Meio YPD ágar: 2% de glicose, 2% de triptona, 1% de extrato de lêvedo e 2% de ágar.
- Meio YPGly: 4% glicerol, 2% de triptona e 1% de extrato de lêvedo.
- Cepa: BY4741 de genótipo *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*.
- Cepa BY4741 – lacZ: BY4741 modificada com o plasmídio pSF-PvSR2-lacZ.
- Cepa BY4741 – GFP: BY4741 modificada com o plasmídio pSF-PvSR2-GFP.
- Cepa 8 e 9: cepas de *S.cerevisiae* BY4741 mutantes que possuem uma fusão entre o gene repórter *lacZ* e o promotor *cat1* que codifica a enzima catalase.
- $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$
- CaCl_2
- Na_2CO_3
- Tampão Z: 60 mM de Na_2HPO_4 , 40 mM de NaH_2PO_2 , 10 mM de KCl, 1 mM de MgSO_4 e 50 mM de β – mercaptaetanol.

4.2. Construção do plasmídio *in silico*

Utilizando o programa DNASTar®, foram construídos os mapas dos plasmídios pSF-PvSR2-GFP e pSF-PvSR2-lacZ, com parte da sequência do promotor PvSR2 de 738 pares de base, mostrada abaixo, e as sequências personalizadas sem o promotor dos plasmídios OG550, para o gene repórter GFP, e OG544, para o gene repórter lacZ, disponibilizados pela Oxford Genetics®.

```

TTCTTCCTACATCTCACCCATATAAAATGTAAATTTTTATTTTTTTTCATCCTCGTAGAT
TTTTATAATTTAAAATTAATTTTAAAAAATTATATATTTTATATTATATAATTTGGAAAGTTAA
TCTCAAATTTTAAAATAATTTTGTAGATTATGTAATTCAGAACTAATCTCATATTTAAAAAA
AATTCAGATTATATAATTTGTAACTAATTACGTATAAGAAAACTTTTTATTACATAACTC
AAAAATTAATATTATATTTAAAATAATATTTAAAAAGAAATTTAAATTATATAATCCAAAATATT
ACCTAAATCGAGAGAAAAACAACGTATGGAGATGTGGAAGAAACGGTCGGCTTTAAGTT
ATACCAAAAATGGAGCGGGTTATATTTTTGGGTAAAAATGTGGTGTGTTGTGACCCTTAGA
AAAAAATATCTATTGTGATTTTTTAAGATCAATTTAATTTAAATGCAGGCGTTTTTATATTT
GAAAGAAAATATTCAAAATTCTACCCTGTTTTGAACTTAACCTTTAAGGAAGCAATAACG
TGGAAAATCCAAGATTTTGTTCAGCGCAGTTGAGAAGAAACGCGATTTGTCTCGCTTTCT
GAACATAAATTCGTTTCTATTCCCATACACCCTTTTCCTTCTATAAATTCACAAATTCCCC
AATTCTTCACCAATTTCCACCAAAACCTAAACCCCAAAACAATCTTCACAGTTCCATCCAT
G

```


4.3. Transformação

4.3.1. Transformação em *E. coli*

4.3.1.1. Preparo de células competentes

A partir de 500µL um pré-inóculo de *E.coli* JM109 crescido overnight, foi feito um inóculo em 50 mL de meio LB, que por sua vez foi incubado a 37°C e 200 rpm até atingir OD₆₀₀ igual a 0,2. Então, a suspensão foi centrifugada a 4°C e 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensão vagarosamente em 10 mL de solução 50 mM de CaCl₂. Após repetir essa lavagem por duas vezes, a suspensão foi novamente centrifugada sob as mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensão em 1,0 mL da solução gelada de CaCl₂ e mantidas em banho de gelo por 3 horas.

4.3.1.2. Transformação

Em tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 200 µL de células competentes de *E.coli* JM109, foram adicionados 500 ng de plasmídio. A suspensão foi então colocada em banho de gelo por 30 minutos e em seguida incubada a 42 °C por 3 minutos. Após o choque térmico, foi adicionado 1,0 mL de meio LB à suspensão e esta foi incubada à 37 °C e 200 rpm por 1 hora. Então, 100 µL da suspensão foram plaqueados em meio LB ágar contendo 50 µg/mL do agente seletivo kanamicina e as placas semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

4.3.2. Extração do plasmídio

Foi feito um pré-inóculo a partir de uma colônia isolada de *E. coli* transformada em 5 mL de meio LB e estes foram incubados a 37°C e 200 rpm por 16 horas.

A extração dos plasmídios com o gene repórter GFP e lacZ transformados em *E. coli* foi feita a partir dos pré-inóculos utilizando o kit MiniPrep da QIAGEN, seguindo o protocolo de extração do próprio kit. Os plasmídios extraídos foram estocados em freezer a -20°C.

4.3.3. Transformação em *S. cerevisiae*

Em um tubo Falcon de 50 mL foi feito um inóculo de alçada de *S. cerevisiae* BY4741 em 5 mL de meio YPD e este foi incubado overnight a 28 °C e 160 rpm. Ao chegar na fase estacionária, foram coletados 200 µL de células em um tubo eppendorf de 1,5 mL. A suspensão foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 segundos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em (85 µL - VDNA) de tampão OneStep, 10 µL de DTT, 5 µL de DNA de esperma de salmão e em um volume da solução de DNA plasmidial correspondente à 1000 ng de plasmídio, de modo que o volume final da suspensão fosse 100 µL.

A suspensão foi incubada a 45 °C por 1 hora e então, 100 µL desta foram plaqueados em meio DO. As placas semeadas foram incubadas por 3 dias em estufa a 28 °C.

4.4. Curva de peso seco

Em erlenmeyers de 125 mL foram feitos inóculos de alçada em 25 mL de meio DO de ambas as cepas mutantes BY4741 – lacZ e BY4741 – GFP. Os inóculos foram incubados a 28°C e 160 rpm até que fosse observada uma OD₅₇₀ de 0,5 com diluição de 10 vezes. Então uma alíquota de 5 mL foi tomada de cada inóculo, filtrada e a biomassa retida no papel de filtro foi seca sob lâmpadas de infravermelho. A massa de células secas foi pesada até atingir um valor constante, e esse valor de massa foi utilizado no cálculo do fator de peso seco. Enquanto as células estavam secando, foi feita uma curva com diferentes diluições dos inóculos e os valores de OD₅₇₀ dessas diluições foram utilizados para calcular a concentração celular, dada pela massa pesada dividido pelo volume da alíquota filtrada.

A curva de peso seco foi traçada com valores de OD₅₇₀ das diluições contra as diferentes concentrações celulares das diluições. O fator de peso seco equivale ao inverso do coeficiente angular fornecido pelo ajuste linear deste gráfico.

4.5. Curva de crescimento

Em erlenmeyers de 125 mL foram feitos inóculos de 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL e de alçada em 25 mL de meio DO de ambas as cepas mutantes BY4741 – lacZ e BY4741 – GFP. Os inóculos foram incubados a 28°C e 160 rpm por 16 horas e então de hora em hora foi medida a OD₅₇₀ de todos os inóculos e calculada a concentração celular em mg/mL. Foram tomados pontos até que fosse possível expressar um padrão de crescimento celular em uma única curva.

4.6. Replica plating

Em erlenmeyers de 50 mL, foram feitos dois inóculos das cepas mutantes BY4741 – lacZ e BY4741 – GFP em 10 mL de meio DO. Então os inóculos foram incubados a 28°C e 160 rpm overnight. Após atingida a fase de crescimento desejada, um volume de suspensão foi coletado, separado em eppendorfs distintos e diluído de modo que a concentração celular final neste fosse de 160 µg/mL. A partir deste eppendorf, foram feitas diluições seriadas em microplaca, onde a concentração celular nos poços era de 40 µg/mL no primeiro, 8 µg/mL no segundo, 4 µg/mL no terceiro, 0,8µg/mL no quarto, 0,4 µg/mL no quinto e 0,08µg/mL no sexto.

Após o preparo da placa, com uma pipeta multicanal, foram tomadas alíquotas de 5 µL de cada poço e essas alíquotas foram colocadas sobre as placas de Petri contendo meio DO ágar com concentrações de Cd²⁺ variando de 0 a 100 µM.

4.7. Análise de fluorescência

4.7.1. Leitor de microplacas

Foram feitos inóculos da cepa mutante BY – GFP em meio DO, a 28°C e agitação de 160 rpm. Quando as células atingiram a fase de crescimento desejada, foram adicionados aos inóculos volumes de uma solução estoque de 50 mM do indutor Cd²⁺, de modo que a concentração final deste cátion ficasse entre 0 e 100 µM para indução por 24 horas, 1 mM para indução por 1 hora, ambas a 28 °C e 160 rpm ou ainda concentração de 25 µM para indução diretamente na microplaca a temperatura ambiente e sem agitação.

Após a indução, foram adicionados 200 µL de células nos poços de uma microplaca. A fluorescência foi avaliada utilizando o leitor de microplaca SpectraMax® M2e, utilizando os comprimentos de onda de 485 nm e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente.

4.7.2. Microscopia óptica

Foram feitos inóculos da cepa mutante BY4741 – GFP em meio DO com, a 28°C e agitação de 160 rpm. Quando as células atingiram a fase de crescimento desejada, foram submetidas à indução por uma concentração 1,0 mM de Cd²⁺ por 1 hora a 28 °C e 160 rpm.

Como controle positivo de fluorescência, foi utilizada uma cepa de *E. coli* C41 contendo o plasmídeo pET23b_TetO_GFP (*E.coli* mutante) (DRAGOSITS et al., 2012) cujo promotor é induzido por IPTG. Foi feito um inóculo desta cepa a 37°C e 200 rpm, onde 16

horas depois, a expressão de GFP foi induzida por IPTG a uma concentração final de 0,3 mM por 3 horas.

Após a indução, as suspensões foram separadas em tubos Falcon de 50 mL e levadas para análise no microscópio óptico.

4.8. Determinação de atividade β -galactosidase

Foram feitos inóculos da cepa mutante BY4741 – lacZ em meio DO, a 28°C e agitação de 160 rpm. Quando as células atingiram a fase de crescimento desejada, foram adicionados aos inóculos volumes de uma solução de 50 mM do indutor Cd^{2+} , de modo que a concentração final deste cátion ficasse entre 0 e 100 μM . A indução foi feita por 24 horas a 28 °C e 160 rpm.

Após o período de indução, foram coletadas cerca de 50 mg de células por centrifugação e o pellet lavado duas vezes com água destilada fria. O pellet de células foi ressuspense em 0,5 mL tampão Z e a partir deste foi feito um extrato em tubos de parede grossa com 1,5 g de pérolas de vidro por 3 ciclos de 1 minuto alternando entre vortex e gelo. As pérolas de vidro foram lavadas com mais 0,4 mL do tampão Z e a suspensão obtida foi centrifugada em tubos eppendorfs de 2,0 mL a 13.000 rpm por 3 minutos. A concentração de proteínas totais do sobrenadante foi dosada pelo método do biureto modificado por Stickland.

Dosadas as proteínas, volumes de extrato contendo 50 μg de proteína foram adicionados em tubos eppendorfs de 2,0 mL e foi adicionado um volume de tampão Z até completar 800 μL de volume final no tubo. Então, 200 μL de uma solução de concentração 4 mg/mL do substrato orto-nitro-piranogalactosídeo (ONPG) foram adicionados aos eppendorfs e incubadas a 30 °C por 1 hora.

A reação foi parada com a adição de 400 μL de uma solução de Na_2CO_3 1,0 M. A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto e foi feita a leitura da densidade óptica do sobrenadante em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm.

A leitura é feita em 420 nm por ser o comprimento de onda de absorção máxima do o-nitrofenol (ONP), produto da reação de hidrólise do ONPG. A reação pode ser observada na figura 11.

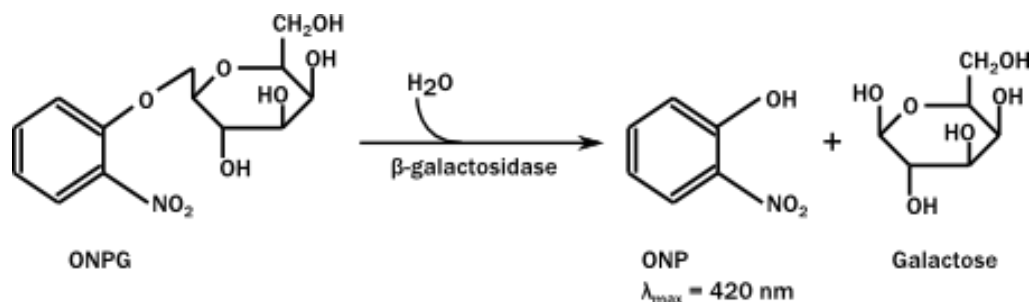


Figura 11: Reação de hidrólise do ONPG catalisada pela enzima β - galactosidase (Fonte: <<http://2011.igem.org/wiki/images/6/6e/ONPG.png>>).

A atividade foi calculada por meio desta equação:

$$Atividade = \frac{OD_{420} * 1,4}{0,0045 * V * [ptn] * t}$$

onde:

OD_{420} = densidade ótica em 420 nm

1,4 = correção do volume final do ensaio de 1,4 mL

0,0045 = absorvância máxima de uma solução 1 μ M de ONPG

V = volume da suspensão de proteína usada

[ptn] = concentração de proteína na suspensão

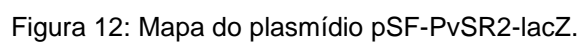
t = tempo de reação

Os valores de atividade foram expressos em U/mg de proteína, onde U equivale a 1 nmol de ONPG convertido por minuto.

5. Resultados e discussão

5.1. Construção *in silico* do mapa do vetor plasmidial e alinhamento

As sequências dos plasmídios construídos pela Oxford Genetics® pSF-PvSR2-GFP e pSF-PvSR2-lacZ foram analisadas *in silico* com o programa DNASTar®. Com ele foram gerados os mapas circulares dos plasmídios, onde é possível observar todos os elementos neles contidos.



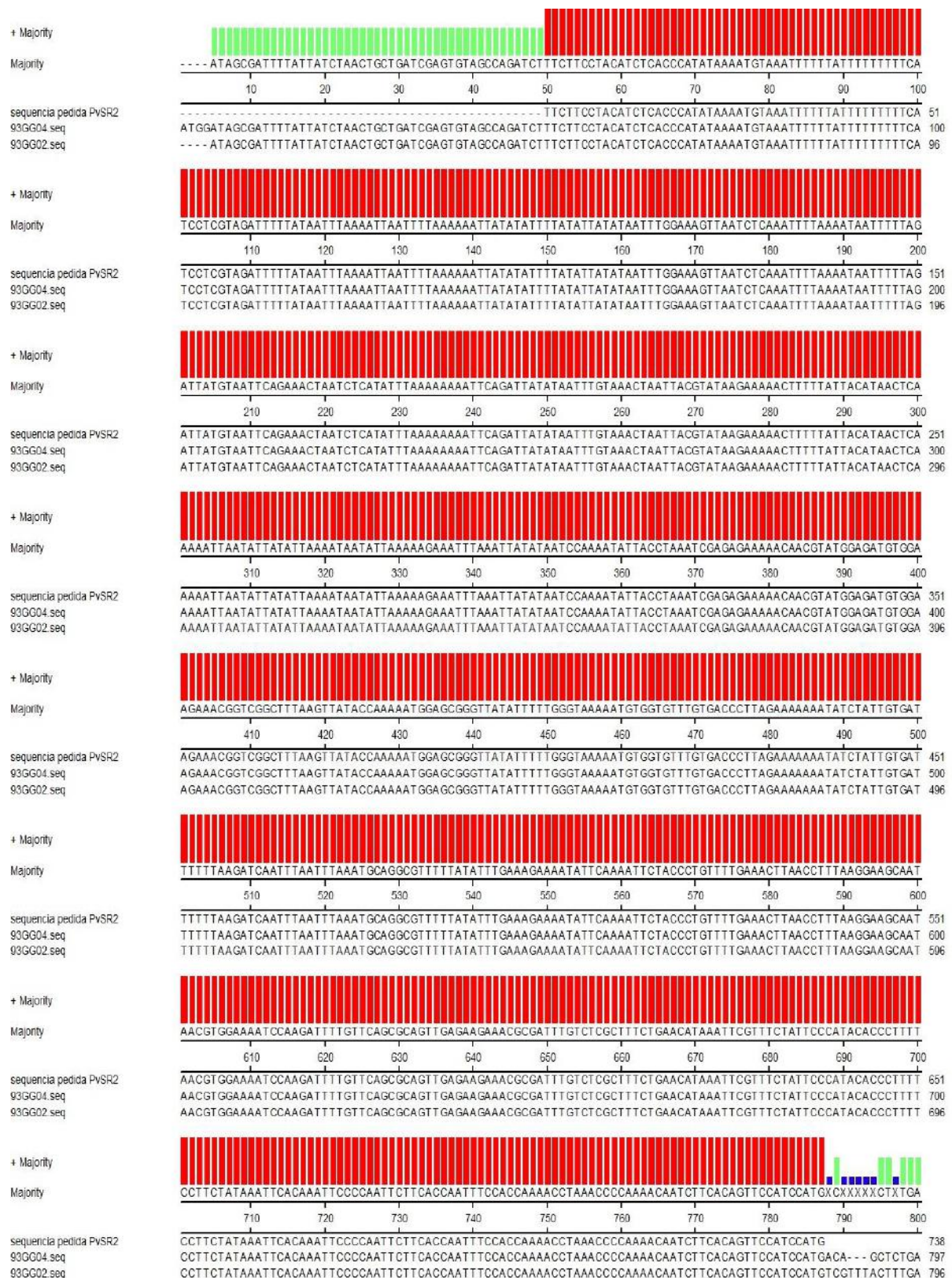


Figura 14: Alinhamento entre as sequências do promotor PvSR2 pedida e as sequências 93GG04 e 93GG02 dos fragmentos dos plasmídios que contém o promotor PvSR2 sintetizada nos plasmídios pSF-PvSR2-GFP e pSF-PvSR2-lacZ respectivamente. Alinhamento feito utilizando o algoritmo Clustal W no programa DNASTar®.

O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo Clustal W e a identidade entre as sequências foi expressa sob a forma de barras coloridas, onde vermelho indica identidade de 100% entre as sequências. Foi verificado que há identidade de 100% entre a sequência do promotor PvSR2 de 738 pares de base solicitada para o estudo e os fragmentos que contém a sequência do promotor sintetizado e inserido nos plasmídios pSF-PvSR2-GFP e pSF-PvSR2-lacZ, ou seja, as sequências são exatamente iguais à solicitada.

5.2. Curva de crescimento

As curvas de crescimento de ambas as cepas mutantes apresenta o perfil diáuxico característico de crescimento de *S.cerevisiae* em glicose, sugerindo que a transformação não interferiu no crescimento celular. As curvas de crescimento das cepas BY4741 – GFP e BY4741 – lacZ podem ser observadas nas figuras 15 e 16, respectivamente.

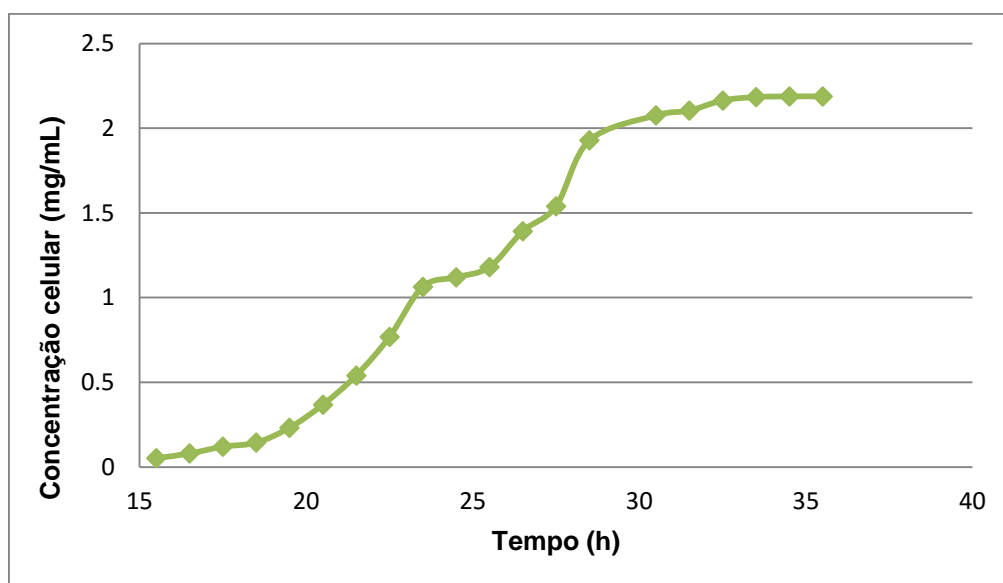


Figura 15: Curva de crescimento da BY4741 – GFP em meio Dropout 2% de glicose. Os pontos foram tomados de hora em hora para leitura da OD₅₇₀ em espectrofotômetro para verificar a concentração celular.

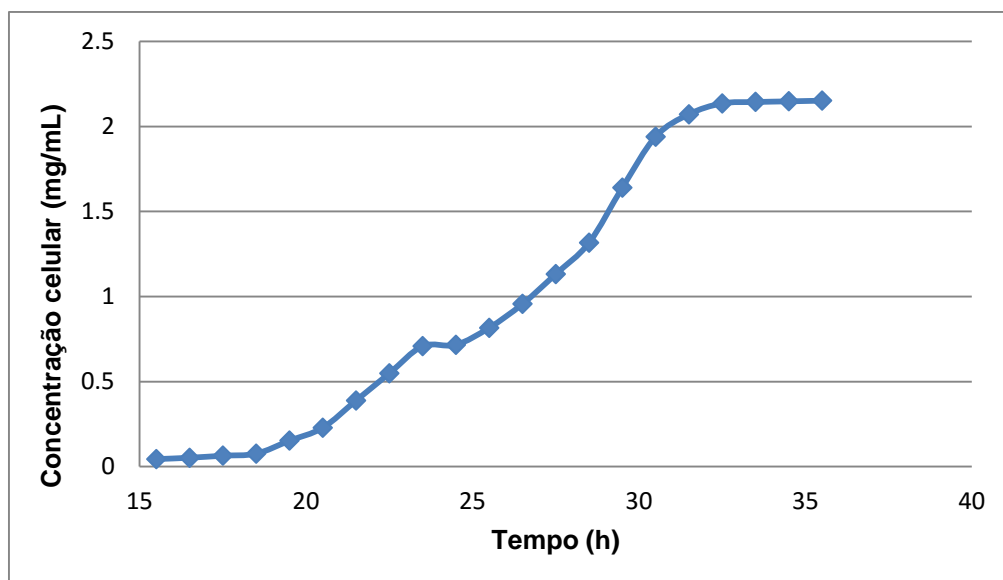


Figura 16: Curva de crescimento da BY4741 – lacZ em meio Dropout 2% de glicose. Os pontos foram tomados de hora em hora para leitura da OD₅₇₀ em espectrofotômetro para verificar a concentração celular.

A curva de crescimento foi utilizada neste estudo para verificar a faixa de concentração celular correspondente às fases de crescimento exponencial e estacionária. Foi observado que para a cepa BY4741 – GFP, as concentrações celulares na fase exponencial varia entre 0,368 e 1,0 mg/mL, enquanto que para a cepa BY4741 – lacZ essa faixa de concentração vai de 0,228 até 0,7 mg/mL.

No caso da fase estacionária, foi verificado que para ambas as cepas a concentração celular correspondente era maior ou igual a 2,1 mg/mL.

5.3. Replica plating

Este experimento foi realizado afim de verificar a tolerância das cepas mutantes frente às crescentes concentrações de Cd²⁺, onde faixa de concentração utilizada foi de 0 - 100 µM.



Figura 17: Replica plating das cepas BY4741 - GFP (G) e BY4741 - lacZ (L) em placas contendo concentrações crescentes de Cd^{2+} . As células foram crescidas até a fase exponencial em meio Dropout 2% de glicose a 28°C e 160 rpm. Da suspensão foi feita uma diluição seriada, onde a concentração celular da esquerda para direita foi de 40 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 0,8 µg/mL, 0,4 µg/mL e 0,08 µg/mL.

No resultado mostrado na figura 17 foi verificado que conforme a concentração de Cd^{2+} aumenta, a quantidade de células diminui. Tal resultado era esperado, uma vez que esse metal já passa a ser citotóxico e genotóxico em concentrações maiores que 5 µM, conforme dito anteriormente. Dessa forma, foi observado que ambas as cepas toleram concentrações de até 100 µM.

Visto que a espécie Cd^{2+} possui efeito inibitório de uma série de enzimas e provoca distúrbios em vias metabólicas, pode-se inferir que concentrações muito superiores a 100 µM de Cd^{2+} poderiam ser tóxicas o suficiente a ponto de inibir o crescimento celular.

5.4. Análise de fluorescência

5.4.1. Leitor de microplacas

Os valores de excitação e emissão de 485 nm e 535 nm respectivamente foram baseados no trabalho de Jayaraman et al (2005).

Na figura 18 foi observado um comportamento não esperado para a BY4741 – GFP. A comparação com o controle negativo BY4741 revelou que os valores de unidades relativas de fluorescência (RFU) para ambas as cepas foram bem próximos. O valor de RFU para a BY4741 – GFP deveria ser no mínimo maior, pois esta seria capaz de expressar a proteína fluorescente GFP por conter o plasmídio que confere à ela essa capacidade.

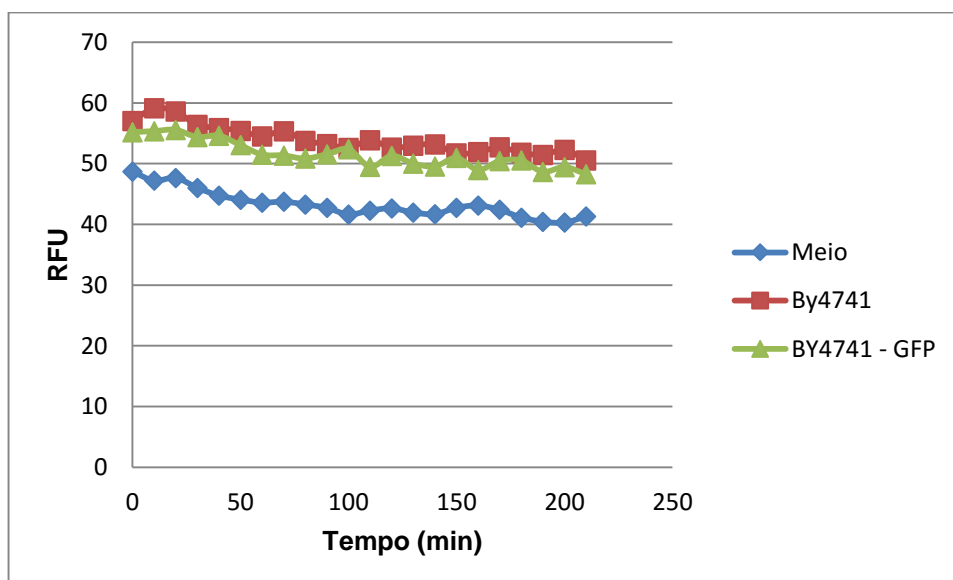


Figura 18: Comparação entre os valores de RFU para o meio Dropout 2% de glicose sem as células (meio) e com a BY4741 e a BY4741 - GFP. No inóculo contendo BY4741 foi adicionado 0,003% de uracila. As células em fase estacionária foram submetidas à uma concentração de 1,0 mM de Cd^{2+} por 1 hora a 28°C e 160 rpm. Então 200 μL de suspensão celular foram adicionadas nos poços de uma microplaca e levadas para análise em leitor de microplaca (SpectraMax® M2e). Foram tomados pontos em intervalos de 10 minutos por 200 minutos.

Foi verificado também que ambas as leveduras possuem fluorescência intrínseca, pois os valores de RFU são maiores para os meios contendo as células.

Foi feita uma análise comparativa com um controle positivo de fluorescência em uma cepa de *E.coli* C41 contendo o plasmídio pET 23b-TETO-GFP (*E.coli* mutante), para saber que tipo de valor ou faixa de valor de RFU é equivalente à um organismo que expressa GFP. Tal gráfico pode ser observado na figura 19.

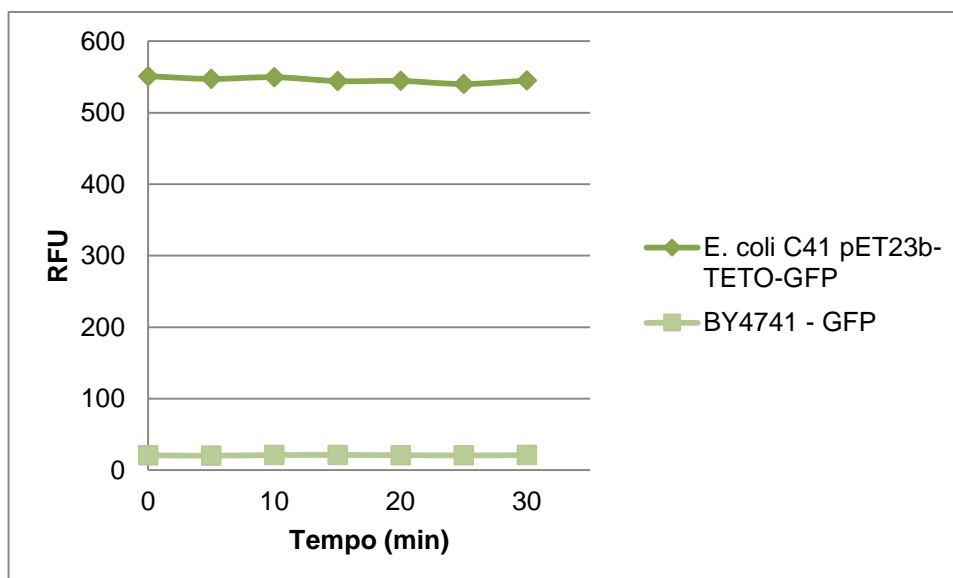


Figura 19: Gráfico com os valores de RFU para a *E.coli* mutante e BY4741 - GFP. As células de *E.coli* mutante foram induzidas por uma concentração de IPTG de 0,3 mM por 3 horas a 37°C e 200 rpm. As células de BY4741 – GFP foram induzidas por uma concentração de 1,0 mM por 1 hora a 28°C e 160 rpm. Então 200 µL das suspensões celulares foram adicionadas nos poços de uma microplaca e levadas para análise em leitor de microplaca (SpectraMax® M2e). Foram tomados pontos em intervalos de 5 minutos durante 30 minutos.

Foi observado que os valores de RFU para a *E.coli* mutante, utilizada como controle positivo para fluorescência, são cerca de 25 vezes maiores que o observado na BY4741 – GFP.

Os resultados apresentados na figura 19 mostram que os valores de RFU observados para a BY4741 – GFP são muito menores que os da *E.coli* mutante, quando eles deveriam ser próximo ou no mínimo, maiores que os níveis de fluorescência intrínseco da levedura.

A concentração de Cd^{2+} utilizada para induzir a expressão da GFP pela BY4741 – GFP no gráfico acima foi de 100 µM. Também foram testadas as concentrações de 0, 10, 25, 50 e 75 µM para um tempo indução de 24 a 72 horas e a concentração de 1 mM por 1 hora, entretanto todas geraram resultados muito próximos aos apresentados na figura 20, sugerindo que ou o GFP não estava sendo expresso, ou se estivesse sendo expresso, estava ou abaixo dos limites de detecção do aparelho ou sofrendo algum tipo de interação que impossibilitasse a detecção de sua fluorescência.

5.4.2. Microscopia óptica

A análise da cepa BY4741 – GFP por microscopia óptica foi conduzida na tentativa de obter evidência da fluorescência, caso estivesse abaixo do limite de detecção do leitor de microplacas.

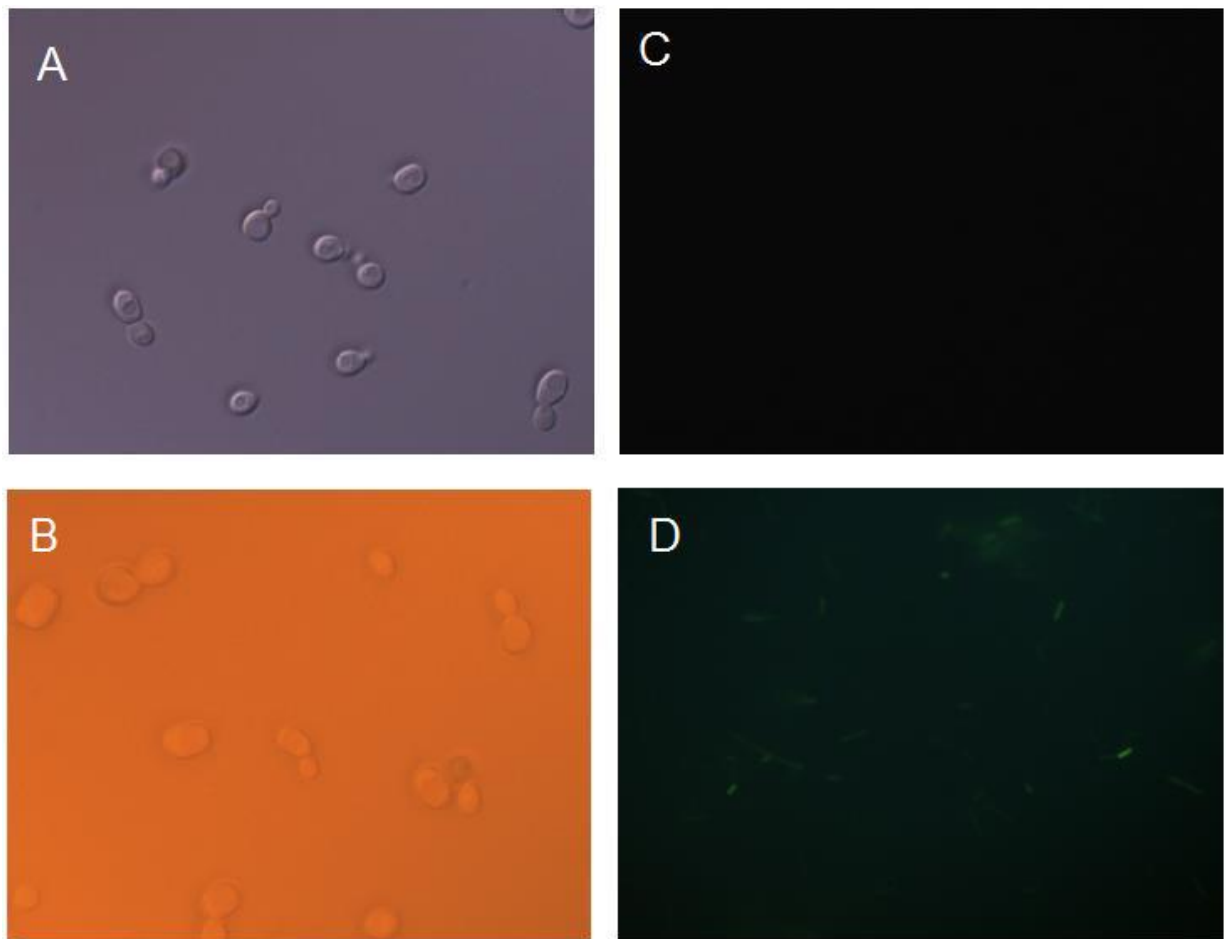


Figura 20: Fotografias obtidas a partir do microscópio óptico. A) BY4741 na contraste de fase. B) BY4741 - GFP na contraste de fase. C) Foto da BY4741 e BY4741 - GFP com o filtro para GFP. D) Foto da *E. coli* mutante com filtro para GFP. No inóculo contendo BY4741 foi adicionado 0,003% de uracila. As células de BY4741 – GFP foram induzidas por uma concentração de 1,0 mM por 1 hora a 28°C e 160 rpm e as células de *E. coli* mutante foram induzidas por uma concentração de IPTG de 0,3 mM por 3 horas. O aumento utilizado foi de 1000 vezes, de modo que a objetiva usada foi a de 100x. O filtro para GFP foi utilizado para possibilitar a visualização da fluorescência verde.

Como observado na figura 20C, não foi verificada fluorescência na BY4741 (controle negativo) e na BY4741 – GFP. Para a BY4741 – GFP era esperado um aspecto semelhante ao observado na *E. coli* mutante, onde é possível observar fluorescência nos microrganismos. Porém é observada apenas uma tela preta, característica do controle

negativo BY4741. Como as cepas BY4741 e BY4741 – GFP apresentaram resultados semelhantes, foi mostrada apenas uma foto (figura 20C), sendo esta representativa de ambas. Esse resultado sugere que não é possível visualizar a fluorescência da BY4741 – GFP mesmo por microscopia óptica.

A força do promotor PvSR2 não foi averiguada neste trabalho, de modo que se este promotor for fraco, é possível inferir que pouco GFP esteja sendo expresso nas condições testadas, de modo que ela não fosse acumulada na célula em quantidade o suficiente para se verificar a fluorescência.

5.5. Atividade β -galactosidase

Utilizando a indução de 1,0 mM de Cd^{2+} por 1 hora a 28 °C e 160 rpm nos inóculos de BY4741 e BY4741 – lacZ, foram obtidos os resultados apresentados no gráfico da figura 21. Foi possível observar que nesta condição indutiva, o valor de atividade específica da BY4741 – lacZ foi cerca de seis vezes maior que o valor da BY4741, sugerindo que a indução por íons Cd^{2+} ocasionaram a expressão da enzima β – galactosidase na BY4741 – lacZ.

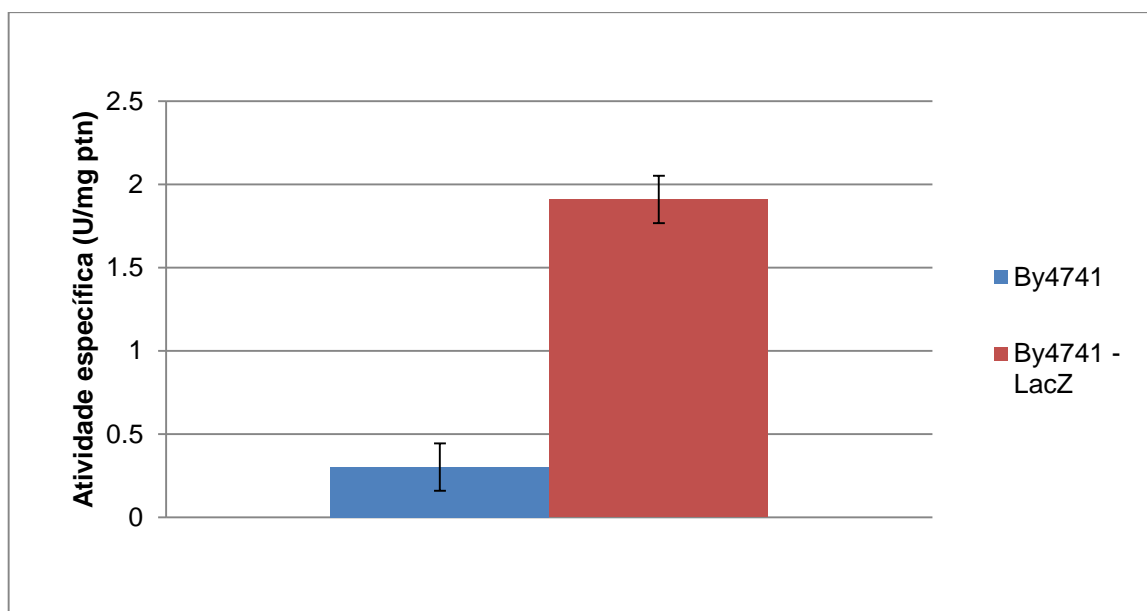


Figura 21: Comparação da atividade β - galactosidase da BY4741 e da BY4741 – lacZ. No inóculo contendo BY4741 foi adicionado 0,003% de uracila. Após atingirem a fase exponencial, as células da BY4741 – lacZ foram submetidas à uma concentração de 1,0 mM de Cd^{2+} por 1 hora a 28°C e 160 rpm. Então foi feito um extrato de proteínas, cuja a concentração foi dosada pelo método de Stickland. A dosagem de atividade específica foi feita por espectrofotometria pela leitura da OD₄₂₀.

Verificada o aumento na atividade mediante a presença do metal frente a atividade da BY4741, buscou-se otimizar as condições para que um maior valor de atividade fosse obtido. Primeiramente, foi testada a atividade em diferentes fases de crescimento (figura 22). Foi observado que em fase estacionária houve maior atividade enzimática que em fase exponencial, resultado que está coerente com a afirmação de Adamis et al (2003) de que as células de *S.cerevisiae* em fase estacionária absorvem mais metal do meio que as em fase exponencial. Para este teste, foi utilizada a mesma condição de indução que o teste anterior.

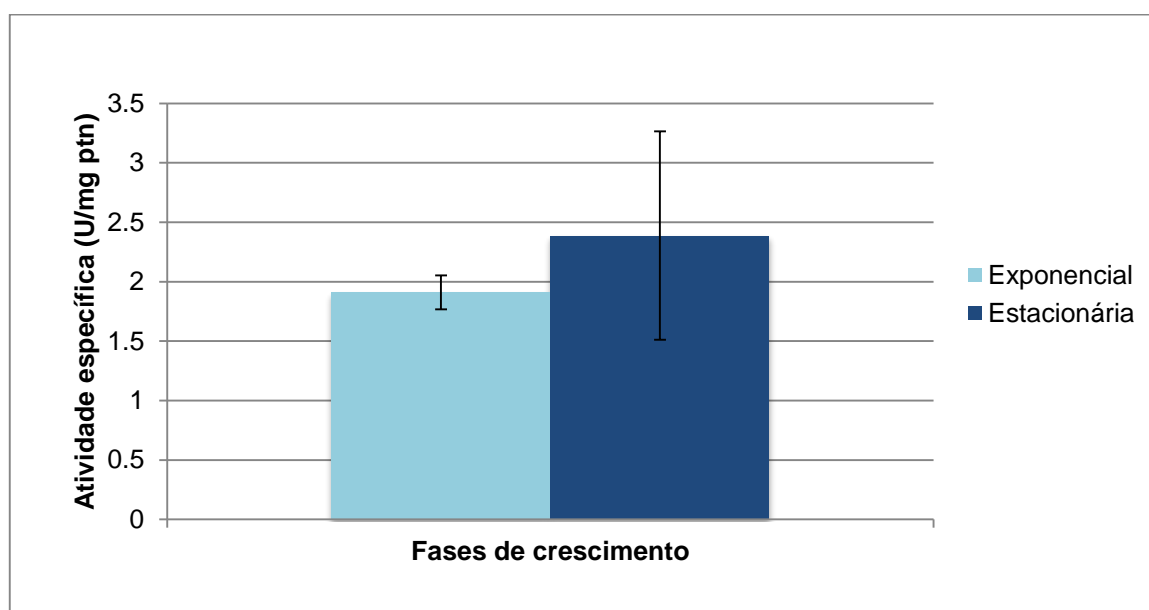


Figura 22: Atividade específica em função das diferentes fases de crescimento da BY4741 – lacZ. Após atingirem a fase de crescimento desejada, as células da BY4741 – lacZ foram submetidas à uma concentração de 1,0 mM de Cd^{2+} por 1 hora a 28°C e 160 rpm. Então foi feito um extrato de proteínas, cuja concentração foi dosada pelo método de Stickland. A dosagem de atividade específica foi feita por espectrofotometria pela leitura da OD_{420} .

Em segundo lugar, foi avaliada qual forma de indução provocaria uma maior atividade enzimática dentre uma indução por 1 hora com uma concentração de Cd^{2+} de 1,0 mM e por 24 horas com concentração de 25 μM . Os maiores valores de atividade foram verificados na condição de indução por 24 horas e concentração de 25 μM do metal (figura 23).

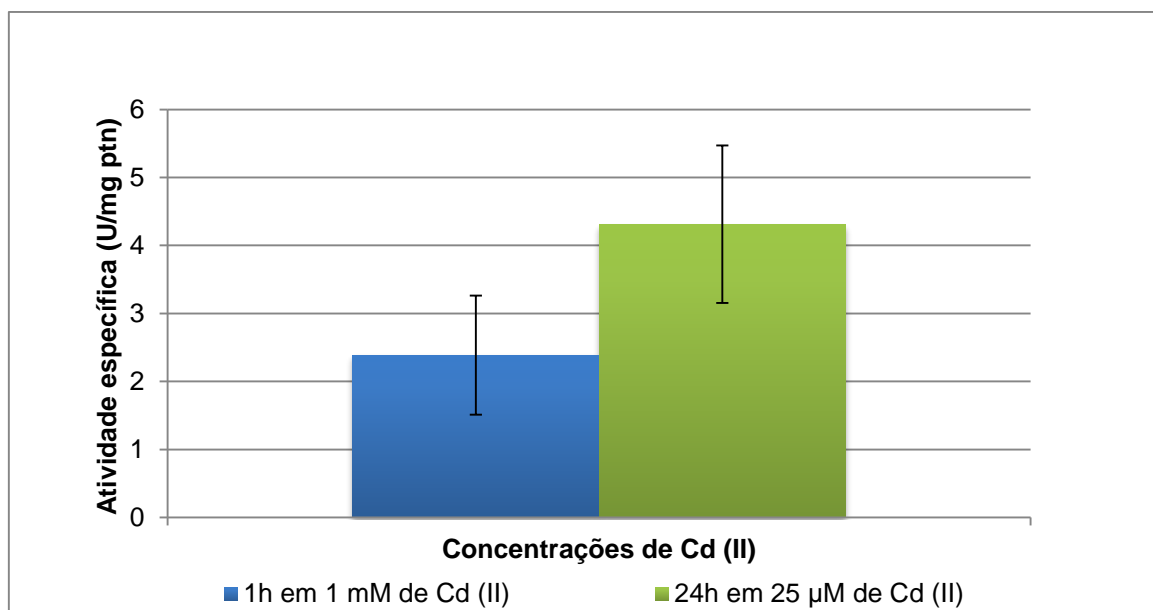


Figura 23: Atividade específica da BY4741 – lacZ em função das diferentes condições de indução. Após atingirem a fase estacionária, as células da BY4741 – lacZ foram submetidas duas condições indutivas: concentração de 1,0 mM de Cd^{2+} por 1 hora e concentração de 25 μM de Cd^{2+} por 24 horas, ambas a 28°C e 160 rpm. Então foi feito um extrato de proteínas, cuja concentração foi dosada pelo método de Stickland. A dosagem de atividade específica foi feita por espectrofotometria pela leitura da OD_{420} .

A terceira variável foi a massa de proteínas no meio reacional. A massa de 10 μg de proteínas sugeridas pelo protocolo foi utilizada até então. Porém, para essa massa de proteína, o tempo total até que se observasse a coloração amarela, característica dessa reação, era de aproximadamente 180 minutos. Visando diminuir o tempo de reação, foi feita uma adaptação do protocolo e foi utilizada uma massa de 50 μg de proteínas.

Como resultado, mostrado na figura 24, foram observados valores de atividade bem próximos dos valores obtidos com 10 μg de proteína, porém o tempo de reação foi reduzido para apenas 60 minutos, ou seja, três vezes menor que o anterior.

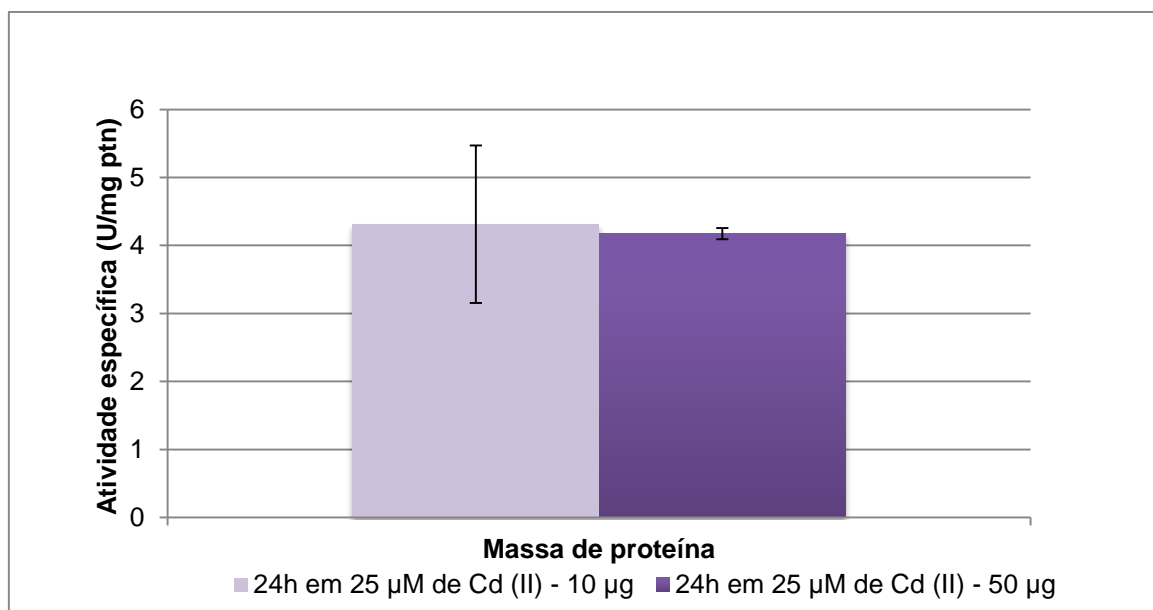


Figura 24: Atividade específica da BY4741 - lacZ em função de diferentes massas de proteínas. Células da BY4741 - lacZ foram submetidas a concentração de 25 µM de Cd²⁺ por 24 horas a 28°C e 160 rpm. Então foi feito um extrato de proteínas, cuja concentração foi dosada pelo método de Stickland. As massas de proteínas utilizadas na dosagem de atividade específica foram de 10 µg segundo o protocolo e 50 µg, adaptação testada neste estudo.

Com base nos testes anteriormente feitos, concluiu-se que a condição que proporcionava o maior valor de atividade em menor tempo de reação era uma indução por 24 horas para uma concentração de 25 µM de Cd²⁺ utilizando 50 µg de proteína para a reação com ONPG.

Tendo estabelecido a melhor condição de indução, foi verificado se a atividade enzimática iria variar de acordo com a concentração de Cd²⁺ em solução. Para isso, foi utilizada a faixa de concentração de 0 a 100 µM (figura 25). Esse tipo de relação é essencial para a classificação desta cepa como um biossensor, segundo sugere Qi et al. (2007).

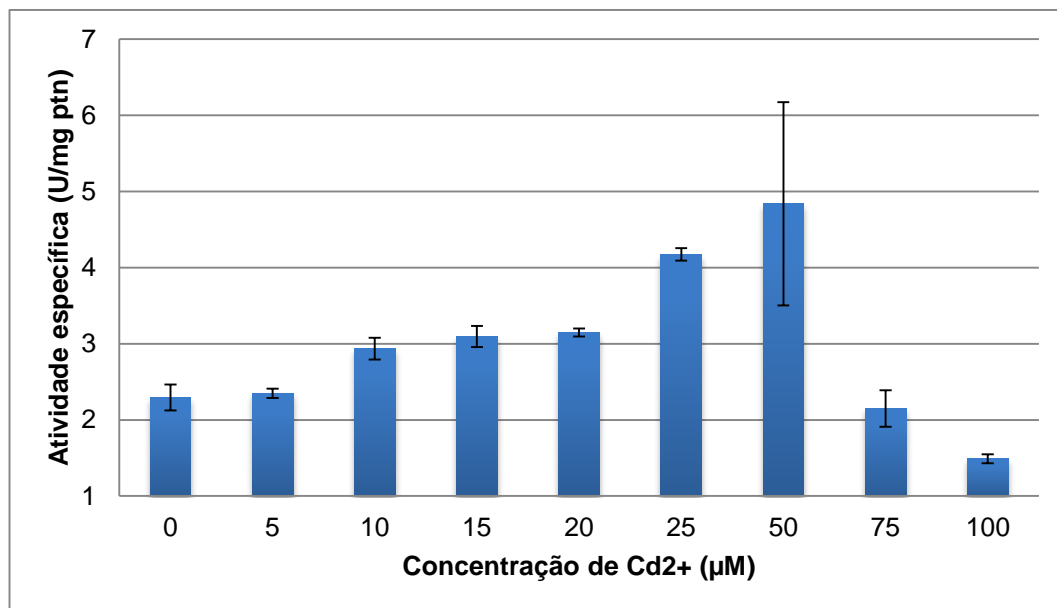


Figura 25: Atividade específica como função da concentração de Cd²⁺. Células da BY4741 – lacZ em fase estacionária foram submetidas a concentrações de Cd²⁺ de 0 a 100 µM por 24 horas a 28°C e 160 rpm. Então, foi feito o extrato de proteínas e, utilizando uma quantidade de proteínas de 50 µg, foi dosada a atividade específica após 60 minutos de reação.

Foi observado que há uma variação na atividade específica de acordo com a concentração de Cd²⁺ presente no meio, onde esta aumenta para concentrações até 50 µM e diminui drasticamente para concentrações superiores. Também foi verificado que o limite de detecção desta cepa é de uma concentração de 10 µM de Cd²⁺ e que o maior valor de atividade específica foi obtido para uma concentração de 50 µM.

Os baixos valores de atividade observados para concentrações de 75 e 100 µM sugerem que para concentrações acima de 50 µM, o efeito indutivo do cádmio é superado pelo efeito tóxico do mesmo, levando a morte celular e consequente perda de atividade.

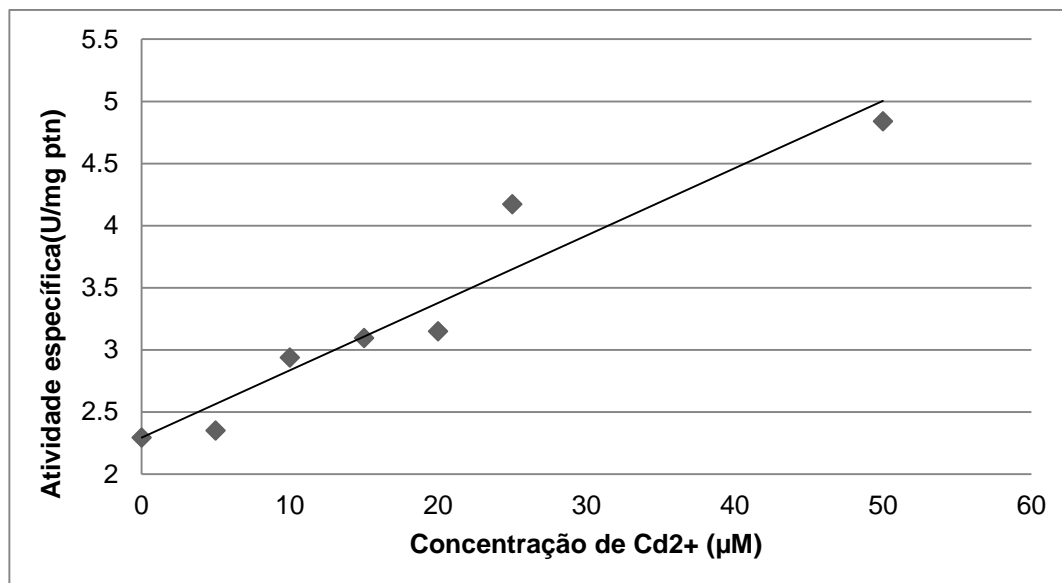


Figura 26: Ajuste linear do gráfico de atividade específica pela concentração de Cd²⁺. Células da BY4741 – lacZ em fase estacionária foram submetidas a concentrações de Cd²⁺ de 0 a 100 µM por 24 horas a 28°C e 160 rpm. Então, foi feito o extrato de proteínas e, utilizando uma quantidade de proteínas de 50 µg, foi dosada a atividade específica após 60 minutos de reação.

Na figura 26, foi feito um ajuste linear para verificar qual o tipo de relação existe entre a atividade específica e a concentração de Cd²⁺ no meio. Foi observado um comportamento linear, apesar de haver oscilações dos valores reais abaixo e acima da reta. Dessa forma, os resultados sugerem que a atividade varia linearmente conforme o aumento de concentração para uma faixa de 0 a 50 µM.

6. Conclusões

Não foi possível observar fluorescência na cepa BY4741 – GFP mediante diversas condições de indução por Cd²⁺, portanto esta cepa não possui potencial para ser empregado como biossensor.

A cepa BY4741 – lacZ apresentou atividade específica crescente para uma faixa de concentração de 0 a 50 µM de Cd²⁺ com limite de detecção de 10 µM, apresentando potencial para ser aplicada como biossensor.

7. Perspectivas

Utilizar outros metais pesados como mercúrio e chumbo e avaliar a resposta das cepas BY4741 – GFP e BY4741 – lacZ a esses metais.

Buscar na literatura outros possíveis promotores que contenham a sequência de resposta a metal ou que apresentem sequências homólogas a esta, para testar com genes repórteres não seletivos, como lacZ, GFP ou outros, e genes repórteres seletivos como o que codifica a síntese de uracila no caso da BY4741.

Avaliar o potencial como biossensor de cepas de *S.cerevisiae* transformadas com essas novas construções.

8. Referências

ABREU. C. A. de, et al., **Routine soil testing to monitor heavy metals and boron**, *Sci. Agric.*, 2005, 62 (6), 564 – 571.

ADAMIS, P. D. B. et al., **Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae***, *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003, 34, 55 – 60.

ADAMIS, P. D. B. et al., **Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium – glutathione complex**, *FEBS Letters*, 583, 2009, 1489 – 1492.

BERTIN, G., e AVERBECK, D. e **Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review)**, *Biochimie*, 2006, 88, 1549 – 1559.

BOTSTEIN, D. e FINK, G. R., **Yeast: An experimental organism for 21st century biology**, *Genetics*, 2011, 189, 695 – 704.

DRAGOSITS et al., **A synthetic biology approach to self-regulatory recombinant protein production in *Escherichia coli***, *Journal of Biological Engineering*, 2012, 6:2

FILIPIČ, M., **Mechanisms of cadmium induced genomic instability**, *Mutation research*, 2012, 733, 69 – 77.

HARTWIG, A., **Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights**, *Biometals*, 2010, 23, 951 – 960.

IARC, **Cadmium and cadmium compounds**, *IARC Monographs on the Evaluations of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon, France, IARC Scientific Publications, 1993.

JAYARAMAN, M. et al., **Engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain BioS-OS1/2, for the detection of oxidative stress**, *Biotechnol. Prog.*, 2005, 21 (5), 1373 – 1379.

JIN, Y. H. et al., **Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair**, *Nature Genetics*, 2003, 34 (3), 326 – 329.

LEI, Y. et al., **Microbial biosensors**, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 568, 200 – 210.

LUSCOMBE, N. M. et al., **What is bioinformatics? An introduction and overview**, *Yearbook of Medical Informatics*, 2001, 83 – 96.

MAGER, W. H. e WINDERICKX, J., **Yeast as a model for medical and medicinal research**, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 2005, 26, 265 – 273.

NORDBERG, G. F. et al., **Handbook on the toxicology of metals**, 3rd ed., London, England, Elsevier, 2007.

OUZOUNIS, C.A. e VALENCIA, A., **Early bioinformatics: the birth of a discipline – a personal view**, *Bioninformatics*, 19 (17), 2003, 2176 – 2190.

QI, X. et al., **Chracterization of a novel plant promoter specifically induced by heavy metal and identification of the promoter regions conferring heavy metal responsiveness**, *Plant Physiology*, 2007, 143, 50 – 59.

Saccharomyce Genome Database. Disponível em <<http://www.yeastgenome.org/>>. Acesso em 24 de agosto 2015.

TURNER, A. P. F., **Biosensors: sense and sensibility**, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 3184 – 3196.

WANG, J. e CHEN C., **Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review**, *Biotechnology Advances*, 2006, 24, 427 – 451.